



TRABAJO FIN DE GRADO

# **Análisis proteómico de la expresión de proteínas en células pro-neuronales relacionadas con el consumo de cannabis**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso 2019-2020

---

Autora: Patricia Martín Gómez

Tutoras: M<sup>a</sup> Carmen Durán Ruiz y Esther Berrocoso Domínguez

Facultad de Ciencias – Universidad de Cádiz

*A mi padre, por sus "Patricia, tú a poquito poco".  
Y por demostrarme, con su ejemplo, que con esos  
"a poquito poco" también se llega.*

*Gracias por cuidarme siempre papá.  
Siempre estarás con nosotros.*

## Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que me han influido y, por lo tanto, ayudado a llegar hasta este punto en el camino.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras, M<sup>a</sup> Carmen Durán Ruiz y Esther Berrocoso Domínguez el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo que me ha hecho sentir aún más fascinación por “Lo que nos pasa por dentro”<sup>1</sup>. He aprendido mucho durante el proceso de elaboración del trabajo. Muchas gracias por vuestra ayuda y consejos.

A todos los profesores de la carrera, por todo lo enseñado a lo largo de estos años. Y, en especial, a María Carbú y a M<sup>a</sup> Carmen quiero agradecerles su labor docente, por la pasión con la que enseñan y transmiten sus conocimientos a los alumnos. Por su buen hacer y disposición. Y, en lo personal, por sus mensajes y palabras de apoyo, cariño y comprensión que traspasaban la pantalla. Gracias de todo corazón.

A Sylvia, por enseñarme a verme en mi propio espejo y en el de nadie más. Por hacerme ver que lo que yo no dispuse, lo que yo no diseñé, para mí no es. Que yo puedo derruir y construir mis propios pilares. Gracias por todas las "charlas", por todo lo que aprendí y por todo lo que aún sigo aprendiendo cada día. Gracias por ayudarme a seguir creciendo, expandir las paredes y pasar a la acción. Gracias, de corazón, por ayudarme a terminar esta etapa.

A mis compañeros, en especial a Javi, Marta, Sandra y Claudio. Por todos los buenos e inolvidables momentos vividos dentro y fuera de las aulas. Por ser *mi familia* de Puerto Real. Por todo lo que compartimos en aquella etapa. Por todo lo aprendido con ellos y de ellos. Por todo lo que nos une, nuestra amistad y cariño. Gracias “pentanales”.

A “Mi Barbi” porque, aunque estemos lejos, siempre la sentiré en la habitación de al lado. Por nuestros cafelitos virtuales y nuestros ratitos de charla que nos alegran el día, la semana y el mes. Porque, de lo que la vida nos iba deparando, nosotras lo íbamos compartiendo. Así ha sido y así será. Por todo eso, y por nuestra amistad infinita, gracias corazón.

---

<sup>1</sup>Punset, E. (2012). *Lo que nos pasa por dentro. Un millón de vidas al descubierto*. Barcelona, España: Ediciones Destino.

A “Mis Pimpollis”, mis compañeras de vida. Elena, Lidia e Isa, tres de mis pilares fundamentales. Por todos y cada uno de los momentos con ellas. Por todo lo compartido, vivido, reído y aprendido a lo largo de estos años. Por tener la gran suerte de tenernos en nuestras vidas. Por esta amistad tan bella y tan nuestra. Gracias mis pimpollitas.

A mi familia, en especial a mis padres. Porque, además de haberme traído a este lado de la vida, me han dado esta gran oportunidad. Por todo lo que me habéis enseñado y por todo lo que habéis trabajado por nuestro “día de mañana”, os estoy agradecida.

A las mujeres de mi vida: mi madre, mis hermanas y mis sobrinas. Por todo su apoyo, cariño y comprensión en estos últimos años. Por mantenernos fuertes y por fortalecernos las unas a las otras. Por compartir y compensar la carga. Por cuidarnos. Os doy las gracias.

A Pepe, Leo y Paula, mis segundos padres y mi tercera hermana. Por todo su cariño y arropo incondicional en estos 11 años. Por quererme tanto y por tenerme como a una hija más. Por tratar de ayudarme y hacerme sentir tan bien siempre. Gracias familia.

A Alberto, “mi vida”. Por tener cogida aún mi mano. Por mostrarme aquello para lo que aún no soy capaz de ver. Por abrirme los ojos y levantar mi cabeza. Por ayudarme a andar mi camino. Por compartir la forma en la que vemos el mundo y la vida. Por todas y cada una de sus miradas, esas que acaban con una sonrisa que ilumina y aviva cada rincón de mi alma. Por todo lo vivido y por todo lo que está por llegar. Gracias mi vida.

A todos y cada uno de vosotros, gracias. Este trabajo alberga y condensa todo lo vivido en estos años. Lo bueno y lo malo. Una etapa en la que la vida me ha enseñado que, en cada momento y a pesar de todo, hay que ser feliz. Una etapa a la que hoy le cuelgo el cartel de "Pasado".

Me dispongo a seguir caminando.

## **Tabla de contenido**

<b>Propuesta del TFG que me fue asignada.....</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS: .....</b>	<b>7</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
3.1. La concienciación sobre el cannabis y la salud mental .....	10
3.2. Biomarcadores del consumo de cannabis como dianas terapéuticas .....	10
3.3. Neuroepitelio olfativo como modelo de estudio.....	12
3.3.1. Aislamiento y cultivo de células pro-neuronales .....	14
3.4. Análisis proteómico para la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas.....	14
3.5. Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas: clasificación y caracterización funcional .....	16
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
5.1. Participantes y aspectos éticos.....	19
5.2. Obtención de muestras: adquisición de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo.....	19
5.3. Cultivo primario de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo .....	20
5.3.1. Ensayo inmunohistoquímico .....	20
5.4. Análisis proteómico .....	22
5.4.1. SDS-PAGE.....	22
5.4.2. Análisis por espectrometría de masas (MS).....	23
5.5. Análisis bioinformático .....	25
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
6.1. Ensayo inmunohistoquímico .....	27
6.2. SDS-PAGE.....	28
6.3. Proteínas diferencialmente expresadas .....	28
6.3.1. Proteínas exclusivas de consumidores de cannabis.....	29
6.3.2. Potenciales dianas terapéuticas: Clasificación y caracterización funcional de las proteínas diferencialmente expresadas .....	29
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>9. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>	<b>43</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>
<b>11. APÉNDICES .....</b>	<b>50</b>
11.1. Listado de proteínas exclusivas de consumidores de cannabis .....	50

11.2. Mapas de rutas metabólicas y vías de señalización proporcionados por DAVID .....	56
--	----

Propuesta del TFG que me fue asignada.

Titulación: GBT
Título: Análisis proteómico de la expresión de proteínas en células pro-neuronales relacionadas con el consumo de cannabis. (propuesta aprobada el curso anterior con el mismo alumno)
Curso: 2019/2020
Tutor1: maricarmen.duran@gm.uca.es (BIOMEDICINA,BIOTECNOLOGIA Y SALUD PUBLICA)
Tutor2: esther.berrocoso@uca.es, (PSICOLOGIA )
Carácter: Trabajo investigación en laboratorio
Descripción:  Los biomarcadores son moléculas alteradas en condiciones patológicas que resultan herramientas objetivas y cuantificables muy útiles para el diagnóstico de una determinada enfermedad o la respuesta a una terapia específica. En lo relacionado al consumo de cannabis y sus posibles efectos adversos a nivel neuronal, la búsqueda de biomarcadores se ha visto frenada por la imposibilidad de obtener muestras cerebrales de pacientes vivos. En el presente trabajo se va a analizar un novedoso sistema in vitro basado en el uso de precursores neuronales (pro-neuronas) obtenidos del neuroepitelio nasal de individuos adultos que han consumido cannabis durante la adolescencia. Se persigue la identificación de proteínas diferencialmente expresadas entre células de consumidores de cannabis y células obtenidas de individuos sanos. Para ello se emplearán herramientas proteómicas, fundamentalmente electroforesis en geles de acrilamida y espectrometría de masas para la detección e identificación de proteínas diferencialmente expresadas. Se utilizarán varias herramientas bioinformáticas para el procesamiento e interpretación de los datos resultantes.
Alumno propuesto: patricia.martigomez@alum.uca.es
Curso: 2019/2020
Fecha: 25/02/2020 13:52:49
Es propuesta de alumno: SÍ; 2 Aceptada profesor: SÍ; Aceptada depto.: SÍ; Aceptada comisión: SÍ.

## ABREVIATURAS:

**AMBIC:** Ammonium bicarbonate (Bicarbonato amónico)

**APS:** Amonium persulfate (Persulfato amónico)

**BSA:** Bovine Serum Albumin (Albúmina de Suero Bovino)

**CC:** Consumo Cannabis

**CS:** Control Sano

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamino-2-fenilindol)

**DMEM/F-12:** Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F-12

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DTT:** Ditiotreititol

**ESI:** Electrospray Ionization (Ionización por electrospray)

**FBS:** Fetal Bovine Serum (Suero bovino fetal)

**GBC:** Global Basal Cell (Célula Basal Globosa)

**GSH:** Glutación en su forma reducida.

**HBC:** Horizontal Basal Cell (Célula Basal Horizontal)

**IA:** Iodoacetamide (Yodoacetamida)

**iPSC:** induced Pluripotent Stem Cell (Células madre pluripotentes inducidas)

**LC:** Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida)

**LP:** Lamina Propria (Lámina Propia)

**MS:** Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)

**NeuN:** Nueronal Nuclei (Proteína nuclear neuronal)

**OB:** Olfactory Bulb (Bulbo Olfatorio)

**OM:** Olfactory Mucosa (Mucosa Olfatoria)

**ONE:** Olfactory Neuroepithelium (Neuroepitelio Olfativo)

**OSN:** Olfactory Sensory Neuron (Neurona Sensorial Olfativa)

**PBS:** Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

**PFA:** Paraformaldehyde (Paraformaldehído)

**Q-TOF:** Quadrupole – Time of Flight (Cuadrupolo – Tiempo de vuelo)

**ROS:** Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del oxígeno)

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico)

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

**THC:**  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol



## 1. RESUMEN

Los biomarcadores son parámetros biológicos que pueden ser medidos y evaluados de forma objetiva como indicadores de un proceso o estado alterado como consecuencia de una condición patológica. En relación al consumo de cannabis y sus posibles efectos neurobiológicos en el sistema nervioso, la búsqueda de estos marcadores o determinantes biológicos se ha visto frenada ante la imposibilidad de obtener muestras de tejido cerebral de individuos consumidores vivos. La ausencia de modelos tisulares y celulares adecuados y los métodos de estudio utilizados hasta la fecha limitan el análisis, la valoración e identificación de estas moléculas.

En el presente trabajo, se propone como modelo de estudio un sistema de cultivo *in vitro* de células pro-neuronales obtenidas del neuroepitelio olfativo de individuos adultos que consumieron cannabis durante la adolescencia. En este contexto, se pretende identificar las proteínas diferencialmente expresadas en la condición de consumo con respecto a la condición de control. Para ello, se han comparado los perfiles de expresión de proteínas en células derivadas de individuos sanos y células derivadas de consumidores de cannabis. Para la consecución de esta labor, se realizó un análisis proteómico basándonos en herramientas como la electroforesis en geles de poliacrilamida y la espectrometría de masas, ambas técnicas fundamentales en la detección e identificación de dichas proteínas.

Para el posterior procesamiento e interpretación de los datos obtenidos se realizó un análisis bioinformático. En primer lugar, haciendo uso del software online Venny, se determinó cuántas y cuáles de las proteínas identificadas eran exclusivas de los consumidores. Tras ello, haciendo uso de plataformas y bases de datos online (DAVID, String y Panther) se procedió a la clasificación y caracterización funcional de las mismas con objeto de analizar cuáles de estas proteínas exclusivas podrían ser consideradas, tras futuras validaciones, como potenciales dianas terapéuticas asociadas al consumo abusivo de cannabis, así como las patologías neurobiológicas asociadas.

Como resultado, se identificaron un total de 178 proteínas exclusivas del consumo de cannabis, de las cuales solo un grupo mayoritario de 27 proteínas, 22 de ellas relacionadas con el metabolismo y las otras 5 relacionadas con el estrés oxidativo, fueron consideradas para ser validadas como futuras dianas terapéuticas.

## 2. SUMMARY

Biomarkers are biological parameters that can be objectively measured and evaluated as indicators of an altered process or state as a consequence of a pathological condition. In relation to cannabis use and its possible neurobiological effects on the nervous system, the search for these markers or biological determinants has been slowed down due to the impossibility of obtaining brain tissue samples from living consumers. The absence of adequate tissue and cell models and the study methods used to date have limited the analysis, evaluation and identification of these molecules.

In the present work, an *in vitro* culture system of pro-neuronal cells obtained from the olfactory neuroepithelium of adult individuals who consumed cannabis during adolescence is proposed as a study model. In this context, it is intended to identify the proteins differentially expressed in the consumption condition with respect to the control condition. To do this, the protein expression profiles in cells derived from healthy individuals and cells derived from cannabis users have been compared. To achieve this work, a proteomic analysis was carried out based on tools such as electrophoresis in polyacrylamide gels and mass spectrometry, both fundamental techniques in the detection and identification of these proteins.

For the subsequent processing and interpretation of the data obtained, a bioinformatic analysis was performed. First, using Venny, an online software, for the number of identified proteins that were unique to consumers was determined. After that, making use of platforms and online databases (DAVID, String and Panther), they were classified and functionally characterized in order to analyze these exclusive proteins, they could be considered, after further validations, as potential therapeutic targets linked to the abusive use of cannabis, as well as the associated neurobiological pathologies.

As a result, a total of 178 proteins exclusive to cannabis use were identified, of which only a majority group of 27 proteins, 22 of them related to metabolism and the other 5 related to oxidative stress, were considered to be validated as future therapeutic targets.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. La concienciación sobre el cannabis y la salud mental

El cannabis (*Cannabis sativa*) es la sustancia de abuso más consumida a nivel mundial con 192 millones de consumidores en 2018, de los cuales 11,6 millones eran jóvenes entre 15 y 16 años<sup>1</sup>. La trascendencia de estas cifras en la salud pública supone, como queda recogido en la literatura, una asociación significativa entre el consumo crónico de cannabis y un mayor riesgo de aparición y desarrollo de enfermedades mentales graves como la esquizofrenia<sup>2</sup>. Esta correlación se acentúa aún más si el consumo prolongado cursa durante la adolescencia. Se ha visto que la exposición temprana al cannabis aumenta (moderadamente) el riesgo de síntomas y trastornos psicóticos, así como su aparición temprana en los jóvenes. Además, el efecto es mayor en aquellos con una predisposición genética a la psicosis y con un consumo más severo<sup>3,4</sup>.

Ante este paradigma, y ante un número cada vez mayor de países que están legalizando el consumo de cannabis – tanto para uso recreacional como para fines médicos –, es necesario comprender mejor su impacto en la salud mental. Para ello, es fundamental una investigación pormenorizada de los mecanismos neurobiológicos que se encuentren alterados única y exclusivamente como consecuencia de dicho consumo. Esta información permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más precisas y acertadas en el tratamiento de la adicción al cannabis y sus consecuencias psiquiátricas.

Hasta hace bien poco, el estudio de las alteraciones fisiopatológicas asociadas al cannabis se ha limitado a modelos animales<sup>5</sup> y a técnicas de neuroimagen y tejido *post mortem*<sup>6</sup>. En este último caso, los problemas derivados del deterioro de las muestras hacen de éste un modelo poco representativo y fiable de la funcionalidad y el estado neurofisiológico real del tejido<sup>7</sup>. Por tanto, en este contexto en el que aún carecemos de una valiosa información del tejido neuronal humano vivo, es necesaria una incesante búsqueda y desarrollo de nuevos modelos de estudio que nos permita establecer las bases de un conocimiento completo acerca de los efectos del cannabis en el sistema nervioso humano, así como la identificación de los marcadores moleculares implicados.

#### 3.2. Biomarcadores del consumo de cannabis como dianas terapéuticas

En la búsqueda de marcadores asociados de forma específica al consumo de cannabis y sus efectos en el sistema nervioso, la posibilidad de trabajar con cultivos celulares primarios neurales *in vitro* junto

con la aplicación de herramientas proteómicas constituye una estrategia prometedora que podría ayudar a solventar esa apremiante necesidad.

Un biomarcador es un parámetro biológico que puede ser medido y evaluado objetivamente como un indicador de un proceso o estado biológico normal, patogénico o de respuesta a una intervención terapéutica<sup>8</sup>. Para nuestro estudio, nos fundamentamos en la característica del biomarcador como indicio de la presencia o extensión de un proceso o estado biológico alterado como consecuencia de una condición patológica, en concreto, la exposición al cannabis durante la adolescencia. Este es el contexto en el que enmarcar la búsqueda e identificación de potenciales dianas terapéuticas para la prevención y el tratamiento del consumo abusivo de cannabis, así como las patologías neurobiológicas asociadas.

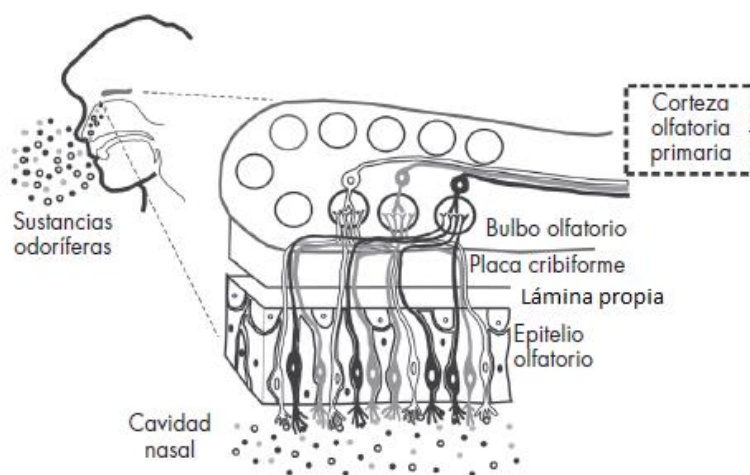
Para ello, lo ideal sería poder obtener biomarcadores del tejido neuronal humano, concretamente de neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC). Pero, ante la imposibilidad de obtener muestras cerebrales de individuos vivos, se han propuesto numerosas células de tejidos periféricos en las que poder identificar marcadores que reflejen los cambios moleculares y celulares que subyacen al consumo de cannabis. Es el caso de las células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas de tejido periférico (células iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*)<sup>9</sup>. Se trata de células cuyos perfiles de expresión génica, al no pertenecer al linaje neuronal, difieren de los exhibidos por las neuronas del SNC. Por tanto, este modelo no sería correcto ni completamente representativo de la condición de estudio. Y lo mismo ocurre con los linfoblastos<sup>10</sup> y los fibroblastos<sup>11</sup>, dos modelos celulares ampliamente utilizados en numerosos estudios relacionados con el cannabis pero que tampoco proceden de un linaje neuronal.

Por su parte, en el ámbito de estudio de las adicciones el uso de las neuronas sensoriales olfativas (OSN, del inglés *Olfactory Sensory Neuron*) del neuroepitelio olfativo (ONE, del inglés *Olfactory Neuroepithelium*) se ha propuesto en los últimos años como modelo de estudio *in vitro* para investigar las consecuencias y disfuncionalidades asociadas al consumo de sustancias de abuso<sup>12</sup>. Con el uso de estas células, al no realizar una reprogramación genética, se evita perder o pasar por alto información crucial para la identificación de biomarcadores. Además, las neuronas del ONE por su fácil acceso, a diferencia de las neuronas del SNC, son obtenidas directamente del individuo vivo<sup>13</sup>. Sin embargo, la toma de muestras no supone un daño tisular excesivo para el individuo debido a la particularidad que caracteriza al ONE, la regeneración y reemplazo continuo de sus neuronas<sup>14-17</sup>.

Las OSNs, por sus características, constituyen un prometedor modelo celular más próximo al SNC para la obtención de determinantes biológicos del cannabis que puedan ser usados como potenciales dianas terapéuticas.

### 3.3. Neuroepitelio olfativo como modelo de estudio

El ONE es un epitelio columnar pseudo-estratificado que reviste las regiones superiores de las paredes y el septum de la cavidad nasal<sup>18</sup>. Junto con la lámina propia (LP, del inglés *Lamina Propria*), un tejido conectivo vascularizado más profundo, constituye la mucosa olfatoria (OM, del inglés *Olfactory Mucosa*). La OM es el componente periférico del sistema olfativo que detecta la señal odorífera. Una lámina o membrana basal separa el ONE de la LP<sup>19-21</sup> (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Anatomía del sistema olfativo humano. La mucosa olfatoria (lámina propia y epitelio olfatorio) y el bulbo olfatorio se encuentran separados por una estructura ósea, la placa cribiforme del hueso etmoides. (Ilustración tomada y modificada de Solís- Chagoyán et al.; 2012<sup>22</sup>).

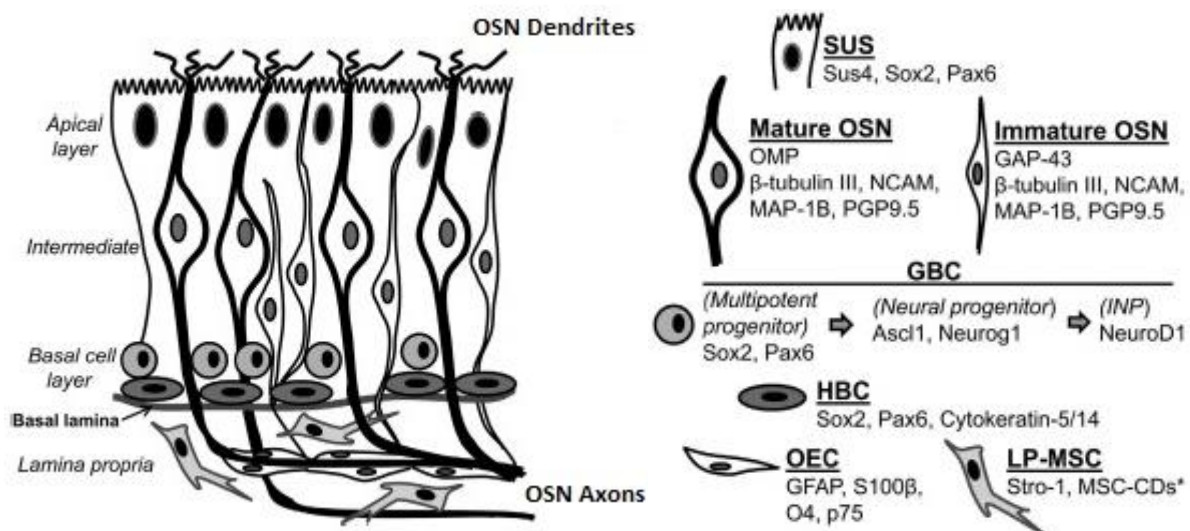
Desde la lámina basal al lumen de la cavidad nasal, los constituyentes celulares del ONE se distribuyen en 3 capas principales (Figura 2).

La capa basal es la más profunda. Está integrada por las células basales, una población que alberga a las células madres y células progenitoras neuronales y no neuronales del tejido. Sobre ellas recae la capacidad regenerativa continua del ONE en mamíferos a lo largo de la vida adulta del organismo<sup>14-17</sup>. En cuanto a la naturaleza de estas células, los trabajos de Calof y Chikaraishi (1989) y de Mackay-Sim y Kittel (1991) sugirieron la existencia en mamíferos de dos poblaciones de células basales con diferentes tasas de división: las células basales horizontales (HBCs, del inglés *Horizontal Basal Cells*),

de división lenta o mitóticamente quiescentes, y las células basales globosas (GBCs, del inglés *Globose Basal Cells*), de división rápida, proliferando activamente. Además, se vio que la población de división rápida migraba desde la capa basal a la capa intermedia, mientras que la población de división lenta permanecía próxima a la membrana basal<sup>23-24</sup>. Esta hipótesis ha sido recientemente corroborada por Durante et al.; 2020 en humanos<sup>17</sup>, donde se reafirma la actividad mitótica quiescente de las HBCs y la proliferación activa de las GBCs. En este y otros artículos también se evidencia la existencia en humanos de células en diferentes estadios de neurogénesis: las HBCs y las GBCs, que se dividen y proliferan dando lugar a los precursores neuronales, los cuales se diferencian en OSNs inmaduras y éstas, finalmente, en OSNs maduras<sup>14, 17, 25</sup> (Figura 2).

La capa intermedia, también conocida como capa neuronal, está conformada por los somas de las OSNs maduras e inmaduras, distribuyéndose éstas últimas más próximas a la capa basal<sup>14, 17</sup>. Por su parte, las OSNs maduras, debido a su naturaleza bipolar, se extienden por completo a lo largo de todo el ONE, orientando sus dendritas hacia el lado apical y sus axones hacia el basal<sup>20</sup> (Figura 2).

La capa apical es la más externa y superficial, en contacto directo con el lumen de la cavidad nasal. Está conformada por células microviliarias y células sustentaculares (de apoyo o soporte), que se extienden hasta la capa basal<sup>20</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Citoarquitectura y características moleculares de la OM. La organización multilaminar de la OM de roedor se muestra a la izquierda y los marcadores moleculares que identifican a las células de la OM de mamíferos in vivo se enumeran a la derecha. **GBC:** célula basal globosa; **HBC:** célula basal horizontal; **INP:** progenitor neural intermedio; **LP-MSC:** célula madre mesenquimal de la lámina propia; **OEC:** célula envolvente olfativa; **OSN:** neurona sensorial olfativa; **SUS:** célula sustentacular. (Ilustración tomada y modificada de Borgmann-Winter et al.; 2015<sup>26</sup>).

La capacidad sensorial de la OM recae sobre las OSNs maduras. Las moléculas odoríferas presentes en el ambiente difunden en la cavidad nasal hasta alcanzar las dendritas, donde son detectadas y reconocidas por sus receptores sensoriales específicos. Tras la unión, la señal química es transducida a señal eléctrica y viaja a lo largo de las neuronas hasta alcanzar el axón. Éste abandona el compartimento basal e ingresa en la LP donde se agrupa con otros axones en fascículos nerviosos que cruzan la placa cribiforme. Cuando los axones alcanzan el bulbo olfatorio (OB, del inglés *Olfactory Bulb*) éstos establecen conexiones sinápticas con neuronas superiores que amplificarán la señal. El OB es el componente central del sistema olfativo que procesa y transmite el estímulo sensorial a áreas cerebrales que terminarán de integrar la información odorífera<sup>21, 22</sup> (Figura 1).

### 3.3.1. Aislamiento y cultivo de células pro-neuronales

En un primer momento, el tejido del ONE se obtenía mediante biopsias de la OM, una práctica de intervención invasiva<sup>18</sup>. Más tarde, se desarrolló un procedimiento para la obtención de muestras mediante un método no invasivo ni doloroso para el sujeto donante. Se trata de una técnica de cepillado de las paredes y el septum de la cavidad nasal en la que el tejido exfoliado es recogido y cultivado *in vitro*. Debido a la capacidad regenerativa del tejido, el exfoliado nasal contiene una población celular mixta, con diferentes células con capacidad proliferativa y con diferente estado de inmadurez. Es por esto que, los medios de cultivo han de contener los componentes adecuados para que se mantengan y proliferen las células de interés: para generar una línea neuronal. De esta forma, se logra la adquisición, aislamiento y cultivo de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo<sup>13</sup>.

### 3.4. Análisis proteómico para la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas

De las pro-neuronas podemos obtener, entre otros, biomarcadores genómicos, transcriptómicos y proteómicos. De todos ellos, los proteómicos son los de mayor interés ya que las proteínas, y no los genes, son las verdaderas responsables del fenotipo que expresa una célula. La razón radica en tanto que el genoma es estático y el proteoma dinámico. Las proteínas están en continuo cambio, sufriendo variaciones cualitativas y cuantitativas en respuesta a estímulos externos e internos.

Por esta razón, el proteoma refleja mejor el estado fisiológico de una célula al permitirnos conocer todas las proteínas expresadas en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas. Por lo que, si comparamos los perfiles proteómicos de dos condiciones distintas, una control y una patológica, en nuestro caso, el consumo de cannabis, podremos identificar ciertas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con la condición patológica. De modo que, los

biomarcadores a identificar serán las proteínas que se encuentren diferencialmente expresadas en los consumidores de cannabis con respecto a los sujetos control.

Para ello, ha de realizarse un análisis proteómico al conjunto de proteínas totales presentes en las células pro-neuronales de individuos consumidores y no consumidores habituales de cannabis durante la adolescencia. A continuación, se detallarán las técnicas proteómicas empleadas en este trabajo: en primer lugar, la separación y visualización de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) y, en segundo lugar, el análisis y la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*).

#### **3.4.1. SDS-PAGE**

La SDS-PAGE es una técnica electroforética que separa a las proteínas en función de su peso molecular. Para ello, el detergente aniónico SDS desnaturaliza a las proteínas y les confiere carga negativa, por lo que, al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico, todas migrarán únicamente hacia el ánodo, el electrodo positivo. Así, la movilidad electroforética de cada proteína dependerá únicamente de su peso molecular<sup>27, 28</sup>.

#### **3.4.2. Espectrometría de Masas (MS)**

La MS es una técnica analítica espectroscópica que, aplicada a la proteómica, permite determinar los pesos moleculares de las proteínas mediante la formación, separación y detección de iones moleculares en función de su relación masa-carga ( $m/z$ )<sup>29</sup>. La MS puede realizarse a proteínas completas o a sus péptidos constituyentes. En este segundo caso, ha de realizarse una digestión enzimática previa, seguida de la ionización de los fragmentos peptídicos resultantes.

El espectrómetro de masas está conformado por una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector de analitos. En la fuente la muestra es ionizada y los analitos son transformados en iones moleculares en fase gaseosa. Éstos son acelerados por la acción de un campo eléctrico hacia el detector en condiciones de alto vacío, atravesando para ello el analizador de masas<sup>30</sup>. Existen distintas combinaciones de fuentes de ionización y analizadores de masas. En este trabajo se utilizó una combinación ESI-Q-TOF: Ionización por electrospray (ESI, del inglés *Electrospray Ionization*) acoplada a un analizador de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF, del inglés *Quadrupole – Time of Flight*).



La ESI es un método de ionización suave donde la muestra es introducida en estado líquido. Por esta razón la ESI es la forma más adecuada de acoplar la cromatografía líquida (LC, del inglés *Liquid Chromatography*) como técnica de separación previa a la MS. Ésta es la valiosa aplicabilidad de la ESI en el análisis y separación de mezclas complejas<sup>29</sup>. Para la ionización, se hace pasar a la muestra por un capilar estrecho al que se aplica una alta diferencia de potencial a presión atmosférica. El resultado es un spray o aerosol de gotas cargadas donde los iones generados se encuentran en solución. Estos iones son direccionados hacia el analizador previa desolvatación<sup>30</sup>.

En el analizador de masas híbrido Q-TOF, el cuadrupolo actuará como un filtro de masas dejando pasar únicamente a los iones con una trayectoria estable. Una vez que los iones han conseguido atravesar el analizador y alcanzan el detector, se mide el tiempo de vuelo: tiempo, dependiente de la masa, que tardan los iones en desplazarse desde la fuente al detector. De modo que, los iones más ligeros, con una masa inferior y, por tanto, con un menor ratio  $m/z$ , son los primeros en llegar y ser detectados<sup>29</sup>.

Finalmente, el detector registra las señales de llegada de todos los analitos y genera un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor  $m/z$ <sup>29</sup>.

### 3.5. Análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas: clasificación y caracterización funcional

Debido al gran volumen de datos que se obtienen, tras el análisis proteómico ha de realizarse un análisis bioinformático. Los distintos recursos bioinformáticos nos permiten de forma rápida y sencilla abordar, procesar e integrar toda la información generada.

En la consecución del objetivo principal de este trabajo, el primer paso es identificar a las proteínas detectadas mediante MS. Para ello, son necesarios motores de búsqueda como la plataforma Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) que compara los resultados obtenidos con la información contenida en bases de datos como Uniprot (<https://ebi16.uniprot.org/>), adjudicándose así a cada proteína problema su identificador único. Una vez reconocida la identidad de las proteínas problema, y quedando todas registradas por su identificador, el siguiente paso es determinar cuántas y cuáles de esas proteínas son exclusivas de los consumidores de cannabis. Para ello, la plataforma Venny (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) puede sernos de gran utilidad. Este software online se fundamenta en los diagramas de Venn, una herramienta de la teoría de conjuntos matemáticos que, aplicada a la proteómica, permite discernir entre elementos comunes (intersección de conjuntos) y elementos exclusivos (diferencia de conjuntos). En nuestro caso, estos conjuntos matemáticos se

corresponden con los listados de las proteínas que se detecten en cada una de las muestras problema. De modo que, al introducir los listados, el programa agrupa a las proteínas en comunes y exclusivas de la condición de interés.

Una vez obtenida la lista de proteínas exclusivas, la tarea final y determinante será hallar entre ellas a proteínas que puedan ser consideradas prometedoras dianas terapéuticas en la investigación de la adicción al cannabis y sus efectos en la salud mental.

Para ello, se recurre a bases de datos online que clasifican a las proteínas en función de varias de sus características: su función molecular, los procesos biológicos, rutas o vías de señalización en los que participe y su localización y/o compartimentación celular, entre otros. De esta forma, podremos caracterizar a las proteínas con la mayor información posible para saber en qué procesos intervienen y qué funciones pueden estar realizando y así tener una imagen más clara de las alteraciones neurobiológicas producidas por el consumo de cannabis.

Algunos de los programas de libre acceso que pueden utilizarse para esta tarea son: String (<https://string-db.org/>), Panther (<http://pantherdb.org/>) y DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov/>). De forma general, los tres clasifican a las proteínas según los parámetros antes mencionados, aunque con algunas particularidades. DAVID, por ejemplo, se utiliza para ver en qué rutas metabólicas o vías de señalización participan las diferentes proteínas introducidas en la búsqueda. Panther, por su parte, emplea diagramas de sectores para clasificar a las proteínas según los diferentes parámetros. Y String muestra un mapa de las interacciones entre las proteínas donde cada proteína está representada por un nodo. La proximidad indica que existe una mayor interconexión entre ellas (por ejemplo, ejercen la misma función molecular, pertenecen a la misma ruta metabólica o vía de señalización, o participan en el mismo proceso biológico). En conjunto, todos facilitan la comprensión e interpretación de los datos al representar la información de una forma gráfica, clara y sencilla.

#### 4. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las propiedades y características de las OSNs como modelo celular representativo del SNC, planteamos que la aplicación de un análisis proteómico centrado en el estudio de células OSNs obtenidas a partir de consumidores de cannabis permitirá la identificación de marcadores asociados a los efectos derivados de dicho consumo en estas células. Según esto, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Cultivar células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo de individuos consumidores y no consumidores de cannabis durante la adolescencia.
2. Realizar un ensayo inmunohistoquímico para evaluar la naturaleza de las células mediante marcadores neuronales específicos.
3. Separar, mediante SDS-PAGE, las proteínas de consumidores y las de no consumidores.
4. Identificar, mediante MS, las proteínas que se encuentren diferencialmente expresadas en cada una de las dos condiciones de estudio.
5. Determinar cuántas y cuáles de las proteínas identificadas son exclusivas de los individuos consumidores de cannabis.
6. Realizar, mediante herramientas bioinformáticas, un análisis de las posibles funciones biológicas de las proteínas identificadas únicamente entre las células de consumidores de cannabis.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Participantes y aspectos éticos

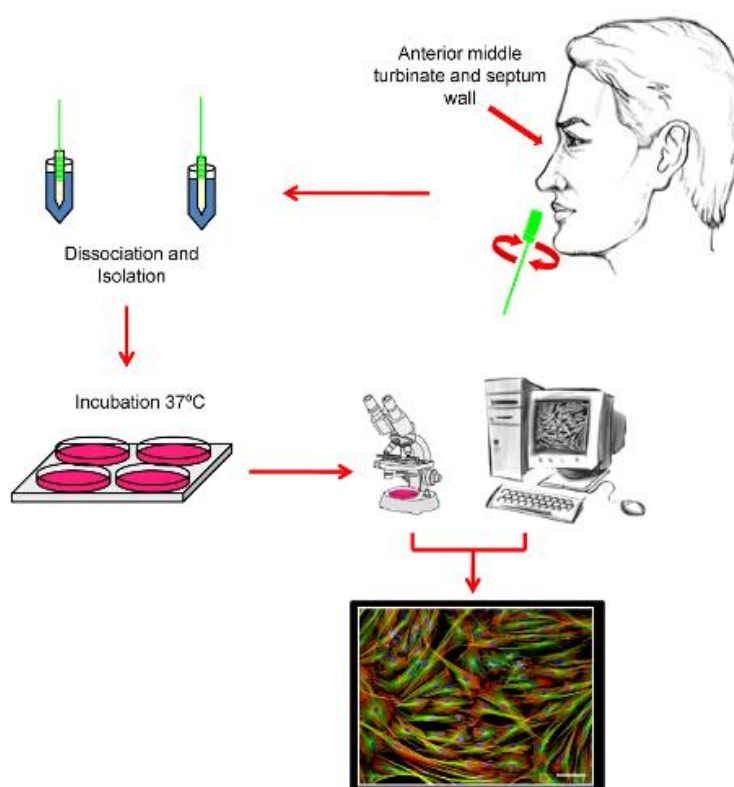
El reclutamiento y valoración de los sujetos participantes, así como la obtención de las muestras biológicas se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Médicas del Hospital del Mar (IMIM) DE Barcelona. Para ello se seleccionaron 4 individuos, con edades comprendidas entre 18 y 40 años, divididos en dos grupos de acuerdo a las dos condiciones de estudio:

- Grupo N.º 1: Sujetos control (n:2); individuos sanos no consumidores de cannabis o cualquier otra sustancia psicoactiva durante la adolescencia (CS, Control Sano: CS1 y CS2).
- Grupo N.º 2: Individuos consumidores regulares de cannabis durante su adolescencia (n:2), ( $\geq 5$  cigarrillos de cannabis a la semana) (CC, Consumo Cannabis: CC1 y CC2).

Todos ellos fueron informados sobre el estudio a realizar y todos dieron su consentimiento para poder hacer uso de sus muestras, así como de los datos derivados de éstas. Este trabajo contó con la evaluación y aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud MAR (CEIC-PSMAR) de Barcelona, y cumple con los principios éticos fundamentales recogidos en la declaración de Helsinki. Además, este trabajo cumple con lo establecido en la legislación vigente española en lo referente a la investigación biomédica y la investigación con células y tejido humano: Ley 14/2007, de 3 de julio, y Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, respectivamente. Asimismo, para garantizar la privacidad de los sujetos y la confidencialidad de los datos, se cumplió con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter personal.

### 5.2. Obtención de muestras: adquisición de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo

La toma de muestras se realizó mediante técnicas de cepillado. Para ello se utilizó un cepillo especial (2,4 cm de largo y 3 mm de diámetro) que mediante movimientos circulares permitió el exfoliado de las paredes y el septum de la cavidad nasal. Seguidamente, se procedió al cultivo de las muestras en medio Dulbecco suplementado con suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) al 10 %, 4 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomina, y 100 UI/ml de penicilina (Figura 3). Esto permitió el mantenimiento de las pro-neuronas que tras tres pases se congelaron a -80 °C y se enviaron a la Universidad de Cádiz.



**Figura 3.** Representación esquemática del procedimiento para la obtención de muestras y la adquisición y cultivo de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo (ilustración tomada de Benitez-King et al.; 2011<sup>13</sup>).

### 5.3. Cultivo primario de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo

Una vez recibidas, las células fueron descongeladas y cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium y F-12 (DMEM/F-12)-GlutaMAX™ suplementado con FBS al 10 %, 4 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 UI/ml de penicilina, manteniéndose al 5 % CO<sub>2</sub> y 37 °C. Una vez que se alcanzó la confluencia, para confirmar la identidad de las células cultivadas, se realizó un ensayo inmunohistoquímico. Para ello, se evaluó la presencia de dos marcadores moleculares específicos de neuronas: la  $\beta$ -actina (una proteína propia de células neuronales)<sup>31</sup> y el marcador NeuN (del inglés *Neuronal Nuclei*, un marcador de neuronas maduras)<sup>32</sup>.

#### 5.3.1. Ensayo inmunohistoquímico

Para proceder al ensayo inmunohistoquímico, se añadió un cubre a cada pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos, y se plaquearon sobre los mismos 40.000 células por condición (células de individuos control y de consumidores de cannabis), incubando en total tres pocillos por condición durante 48 horas a 37 °C, y con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, el medio se retiró y las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA, del inglés *Paraformaldehyde*) al 3,7 % durante 20 minutos. El PFA,

a diferencia de otros compuestos fijadores, no es capaz de permeabilizar a las células para que puedan incorporar los anticuerpos que identificarán a la  $\beta$ -actina y el marcador NeuN, por lo que además de este compuesto, es necesario otro que permita dicha permeabilización. Por ello, pasado el tiempo de fijación, el PFA se eliminó y las células fijadas fueron lavadas y permeabilizadas con Tritón-X100 al 0,1 % en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) durante 10 minutos.

Posteriormente, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios, se procedió al bloqueo de los posibles sitios de unión no específicos. Para ello, las células fueron incubadas con 400  $\mu$ l de tampón de bloqueo (5 % FBS, 3 % albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) en PBS-1X, y 0,1 % de tritón) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo, el tampón se eliminó y las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios: NeuN (200  $\mu$ l en dilución 1:100 en PBS-Tween 20 0,2 % y BSA 1 %) para teñir una nucleoproteína específica de neuronas y  $\beta$ -actina (200  $\mu$ l en dilución 1:100 en PBS-Tween 20) para teñir los microfilamentos de actina del citoesqueleto. La incubación duró toda la noche y se mantuvo a una temperatura de 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS-Tween 20, durante 5 minutos y en agitación. Seguidamente se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios: 200  $\mu$ l de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (para NeuN, de color verde) y 200  $\mu$ l de anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluorocromo Alexa 555 (para la  $\beta$ -actina, de color rojo). Esta incubación duró 45 minutos y se mantuvo en todo momento en condiciones de oscuridad, en agitación y a temperatura ambiente. Tras ello, las células se lavaron dos veces con PBS-1X Tween 20, y los núcleos se marcaron con 200  $\mu$ l de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 2 minutos.

A continuación, se depositó una gota de PBS:Glicerol (9:1) sobre el portaobjetos, se colocaron los cubres encima y éstos fueron sellados con laca transparente. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia, mediante la excitación de los fluorocromos antes mencionados, trabajando por tanto a las longitudes de onda de absorción o excitación y a las longitudes de onda de emisión o relajación de cada uno de los fluorocromos, respectivamente: 358 nm y 461 nm (DAPI), 495 nm y 519 nm (Alexa Fluor 488) y 578 nm y 603 nm (Alexa Fluor 568). Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa de procesamiento de imágenes Zen (Zeiss Microscopy).

#### 5.4. Análisis proteómico

Por otro lado, otro grupo de células control y de consumidores de cannabis se recogieron y congelaron para el posterior análisis proteómico. Para ello, en primer lugar, una placa de células de cada condición (control/cannabis) se incubaron con tripsina para poder separarlas de la placa de cultivo. Luego, se realizó un recuento de células viables mediante el método de exclusión celular con azul de tripán. Tras ello, se tomaron  $10^6$  células por condición y fueron transferidas a tubos eppendorf a los que se les añadió 500  $\mu$ l de medio de cultivo y 500  $\mu$ l de PBS 1X. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 800 g y 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron lavadas y resuspendidas en 1 ml de PBS 1X. Se realizó una segunda centrifugación descartando de nuevo el sobrenadante. Por último, las células fueron congeladas a -80 °C hasta su posterior uso.

##### 5.4.1. SDS-PAGE

En primer lugar, para ver si los patrones de proteínas eran similares en ambos grupos de individuos, se procedió a realizar una electroforesis SDS-PAGE.

###### 5.4.1.1. Gel de electroforesis

El gel electroforético empleado estaba constituido por el gel concentrador (acrilamida 30 %,  $H_2O$ , concentrador 2X, TEMED 10 %, y APS 12,5 %) y el gel separador (acrilamida 30 %,  $H_2O$ , separador 2X, TEMED 10 %, y APS 12,5 %). Primero se procedió a la elaboración del gel separador, pues su distribución en el gel así lo establece. Sus componentes se mezclaron homogéneamente y la mezcla resultante se vertió en un molde de vidrio hasta cubrir  $\frac{3}{4}$  partes del mismo. Luego, se cubrió con isopropanol para que el gel quedase totalmente recto y se esperó varios minutos hasta su completa polimerización. Tras ello, los restos de isopropanol fueron eliminados y se procedió a la elaboración del gel concentrador. Sus componentes se mezclaron homogéneamente y se vertieron en el molde hasta cubrir el espacio restante. Finalmente, se introdujo un peine para crear los pocillos donde se cargarían las muestras a analizar.

###### 5.4.1.2. Preparación de las muestras para electroforesis

El siguiente paso en el transcurso del ensayo proteómico supone la recuperación de las muestras criopreservadas a -80 °C y la lisis celular de las mismas para obtener las proteínas objeto de estudio. Ahora bien, para impedir que estas proteínas fuesen degradadas por las propias proteasas intracelulares, los

precipitados celulares ( $10^6$  células por condición: control sanos y consumo cannabis) fueron resuspendidos en 70  $\mu$ l de tampón Laemmli (50 mM Tris-HCl 6,8, 10 % glicerol, 2 % w/v SDS, 0,1 % azul de bromofenol, 1 %  $\beta$ -mercaptoetanol) diluido (1X). Tras ello, para favorecer la extracción proteica y la eliminación de restos celulares no proteicos, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, y luego se centrifugaron a 11.500 rpm durante 30 segundos.

#### 5.4.1.3. Carga de las muestras en el gel y desarrollo de la electroforesis

Una vez solidificado el gel, se introdujo en la cubeta de electroforesis, se retiró el peine y se cubrió con el tampón de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos en el siguiente orden: 4  $\mu$ l del marcador de peso molecular (Hyperladder II), 20  $\mu$ l de la muestra proteica del individuo control y 20  $\mu$ l de la muestra proteica del individuo consumidor de cannabis. Por último, los electrodos se conectaron a la fuente de electroforesis y se inicia el proceso, aplicando, en primer lugar, una corriente de 80 voltios hasta que las proteínas entraron en el gel y, luego, una de 120 voltios hasta que finalizó el proceso.

#### 5.4.1.4. Tinción y visualización de las proteínas

Una vez concluida la electroforesis, el gel se depositó en un recipiente cubriéndose por completo con solución de tinción Coomassie (35 % metanol, 7 % ácido acético y 2,5 mg de azul de Coomassie). La incubación duró toda la noche, en agitación y a temperatura ambiente.

Al día siguiente se procedió a eliminar el colorante en exceso. Para ello, se retiró la solución de tinción y el gel se incubó dos veces con solución de lavado (35 % metanol y 7 % ácido acético) durante 1 hora. Finalmente, utilizando el equipo ChemiDoc Touch Imaging System de BioRad, se visualizaron los resultados obtenidos y se realizó una fotografía al gel.

#### 5.4.2. Análisis por espectrometría de masas (MS)

Para poder identificar las proteínas expresadas en las células de individuos control y en las de consumidores de cannabis, así como para estudiar la expresión diferencial entre ambas condiciones, las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas (MS).

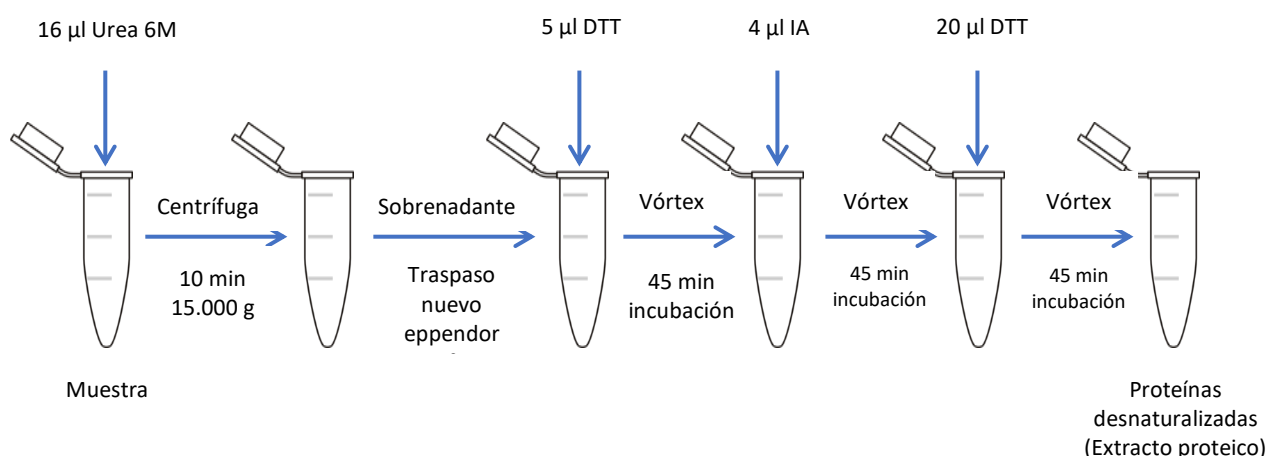


#### 5.4.2.1. Desnaturalización de proteínas

El precipitado celular ( $10^6$  células por condición y muestra), se resuspendió en 16  $\mu$ l de urea 6M (tampón de lisis: 30 mg de urea/83  $\mu$ l de bicarbonato amónico (AMBIC, del inglés *Ammonium bicarbonate*, 50 mM). La urea, además de provocar la lisis celular, como agente caotrópico es capaz de desnaturalizar a las proteínas. Luego, cada muestra fue centrifugada (10 min y 15.000 g) para separar y eliminar los restos celulares (precipitado) del proteoma (sobrenadante) que fue recuperado y transferido a un nuevo eppendorf.

Para seguir favoreciendo la desnaturalización de las proteínas, han de romperse las interacciones intramoleculares, como los enlaces disulfuro, que mantienen su conformación. Para ello, fueron necesarios, y por este orden, dos agentes: uno reductor, el ditioneítritol (DTT), y uno alquilante, la yodoacetamida (IA). El primero redujo los puentes disulfuros dando lugar a grupos tiol (-SH) que fueron posteriormente alquilados por la IA evitando así su oxidación y que se revertiera el proceso. La acción conjunta del DTT con la IA hace que la proteína se encuentre desplegada mejorando el rendimiento durante el proceso de digestión.

Por tanto, en primer lugar, a cada muestra se le adicionó 5  $\mu$ l de DTT (30 mg de DTT/1 ml de AMBIC 100 mM), se homogeneizaron en el vórtex y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 4  $\mu$ l de IA (37 mg de IA/200  $\mu$ l de AMBIC 100 mM) a cada muestra y se siguió el mismo procedimiento que con el DTT (vórtex e incubación durante 45 minutos). Por último, para detener la reacción de alquilación, se adicionaron 20  $\mu$ l de DTT por muestra, se homogeneizó en el vórtex, y se volvió a incubar durante 45 minutos (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de la extracción y desnaturalización de proteínas.

#### 5.4.2.2. Digestión en solución

Una vez concluida la desnaturalización, el extracto proteico fue digerido enzimáticamente con tripsina, escindiéndose las proteínas de forma específica por los extremos carboxilos de los aminoácidos lisina y arginina. Ahora bien, la tripsina, debido a su naturaleza proteica, se desnaturaliza en medio ácido. Por ello, para reducir la concentración de la urea de 6 a 1 M, a cada muestra se le adicionó 50 µl de AMBIC 50 mM. Tras esto, se adicionaron 2,5 µl de tripsina por muestra (20 µg de tripsina/20 µL de AMBIC 50 mM). Tras su homogeneización, las muestras se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, para detener la actividad de la tripsina, las muestras se resuspendieron en 1 µl de ácido fórmico al 5 %. Por último, se secaron usando un Speedvac, guardándolas finalmente a -20 °C hasta su posterior análisis por MS.

#### 5.4.2.3. Análisis por MS

Tras la digestión, las fracciones peptídicas obtenidas de cada muestra fueron analizadas utilizando un sistema LC/ESI-Q-TOF en la unidad de proteómica del CIC-Biogune (Bilbao). Se determinaron las masas moleculares de los péptidos y se identificaron mediante la plataforma Mascot. Los resultados se recopilaron en un archivo Excel y fueron enviados a la Universidad de Cádiz.

#### 5.5. Análisis bioinformático

Para abordar y procesar los datos obtenidos tras la MS y facilitar su análisis se elaboraron dos listados. En el primero se unificaron y anotaron todas las proteínas detectadas en las dos muestras de Control Sano (CS1 y CS2), y en el segundo, se unificaron y anotaron todas las proteínas detectadas en las dos muestras de Consumo de Cannabis (CC1 y CC2). Ambos listados fueron introducidos en el software online Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) y el programa nos mostró cuántas y cuáles de las proteínas identificadas eran exclusivas de los consumidores de cannabis, es decir, estaban presentes únicamente, y por tanto estaban diferencialmente expresadas, en dicha condición.

Finalmente, para concluir el trabajo, se analizó la función de estas proteínas diferenciales mediante herramientas que permiten la clasificación funcional y biológica basándose en bases de datos (GO Ontology fundamentalmente). Esto permitiría analizar cuáles de estas proteínas exclusivas podrían estar ejerciendo un papel significativo en las células ONS en respuesta al consumo de cannabis y por tanto podrían ser consideradas, tras futuras validaciones, como potenciales dianas terapéuticas para revertir o mitigar los daños asociados al consumo crónico de cannabis durante la adolescencia.

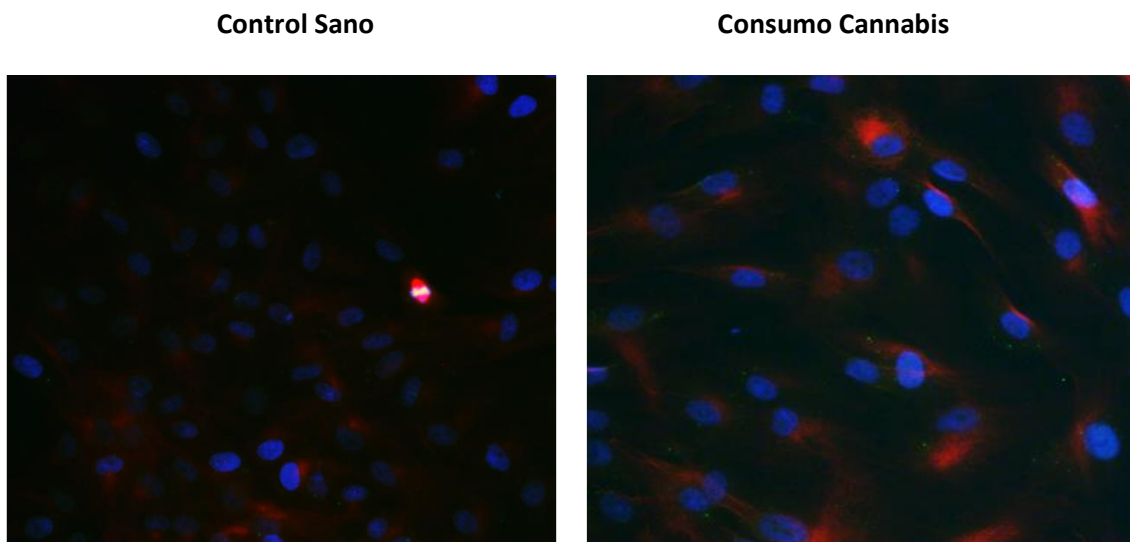
Para ello, el listado de las proteínas exclusivas del consumo de cannabis se analizó de forma paralela en cada uno de estos tres softwares online: String (<https://string-db.org/>), Panther (<http://pantherdb.org/>) y DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), especificando los parámetros de búsqueda en cada uno de ellos. En String, se señaló la opción “Multiple Proteins” y únicamente fue necesario seleccionar la especie objeto de estudio, en nuestro caso, *Homo sapiens*. Por su parte, en Panther se especificó el tipo de lista, “ID List”, la especie, *Homo sapiens*, y el tipo de análisis, clasificación funcional representada en diagramas gráficos circulares. Por último, en DAVID se indicó la opción “Functional Annotation”, el tipo de identificador, “UNIPROT\_ACCESSION” y el tipo de lista, “Gene List”.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Ensayo inmunohistoquímico

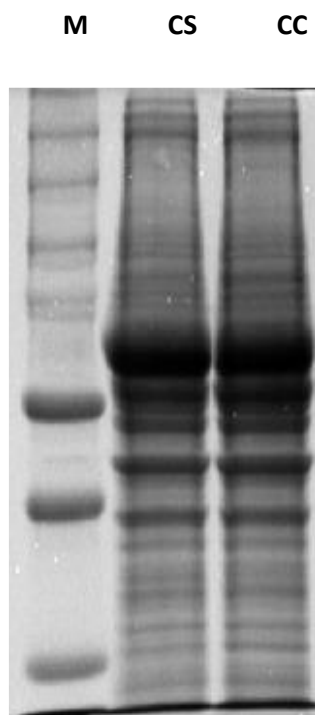
La caracterización molecular de las células derivadas del ONE – tanto de individuos control como de individuos consumidores de cannabis – permitió visualizar los núcleos (en azul, del DAPI) así como confirmar la identidad de las mismas como células pro-neuronales, al detectarse la presencia de dos marcadores neuronales específicos: NeuN (en verde, del fluorocromo Alexa 488, que marca a las neuronas maduras tiñendo una nucleoproteína específica de neuronas) y  $\beta$ -actina (en rojo, del fluorocromo Alexa 555, que marca los microfilamentos de actina del citoesqueleto de neuronas) (Figura 5).

#### Células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo



**Figura 5.** Triple marcaje inmunofluorescente para NeuN (en verde),  $\beta$ -actina (en rojo) y los núcleos celulares (en azul). Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia. Las células procedentes de individuos control se muestran a la izquierda y las células procedentes de consumidores de cannabis a la derecha.

## 6.2. SDS-PAGE



Se realizó con el objeto de separar y visualizar las proteínas expresadas en ambos grupos de individuos, así como para comprobar que las muestras eran representativas y la extracción proteica se llevó a cabo de forma correcta. El análisis electroforético, pues, sirvió además como punto de control para la extracción de las proteínas.

Como puede observarse en la Figura 6, el patrón de separación de proteínas que se obtuvo en ambas muestras fue muy similar, lo que indica, *a priori*, que las proteínas que se expresaron en los individuos control también se expresaron en los consumidores de cannabis.

**Figura 6.** Gel de electroforesis realizado para la separación y visualización de las proteínas presentes en las células pro-neuronales. De izquierda a derecha: M (marcador de peso molecular Hyperladder II), CS (Control Sano) y CC (Consumo Cannabis).

## 6.3. Proteínas diferencialmente expresadas

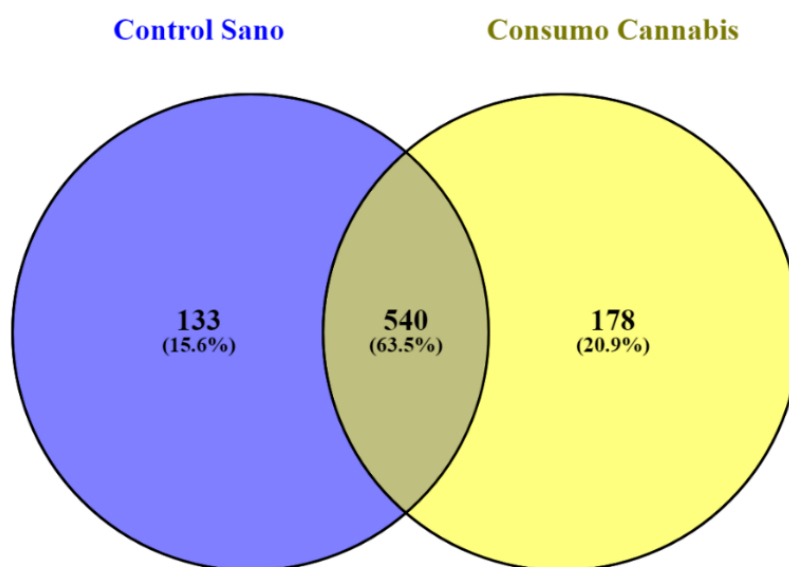
Los resultados obtenidos en la MS se recogieron en un archivo Excel. En él figuraban 4 listados, correspondientes cada uno a las proteínas identificadas en cada muestra: CS1, CS2, CC1 y CC2. Las proteínas estaban representadas con su identificador, el número de acceso de las mismas en la base de datos Uniprot. El número de proteínas detectadas en cada muestra queda indicado en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Proteínas totales identificadas en cada muestra.

Muestra	N.º total de proteínas identificadas
Control Sano 1: CS1	562
Control Sano 2: CS2	503
Consumo de Cannabis 1: CC1	65
Consumo de Cannabis 2: CC2	709

### 6.3.1. Proteínas exclusivas de consumidores de cannabis

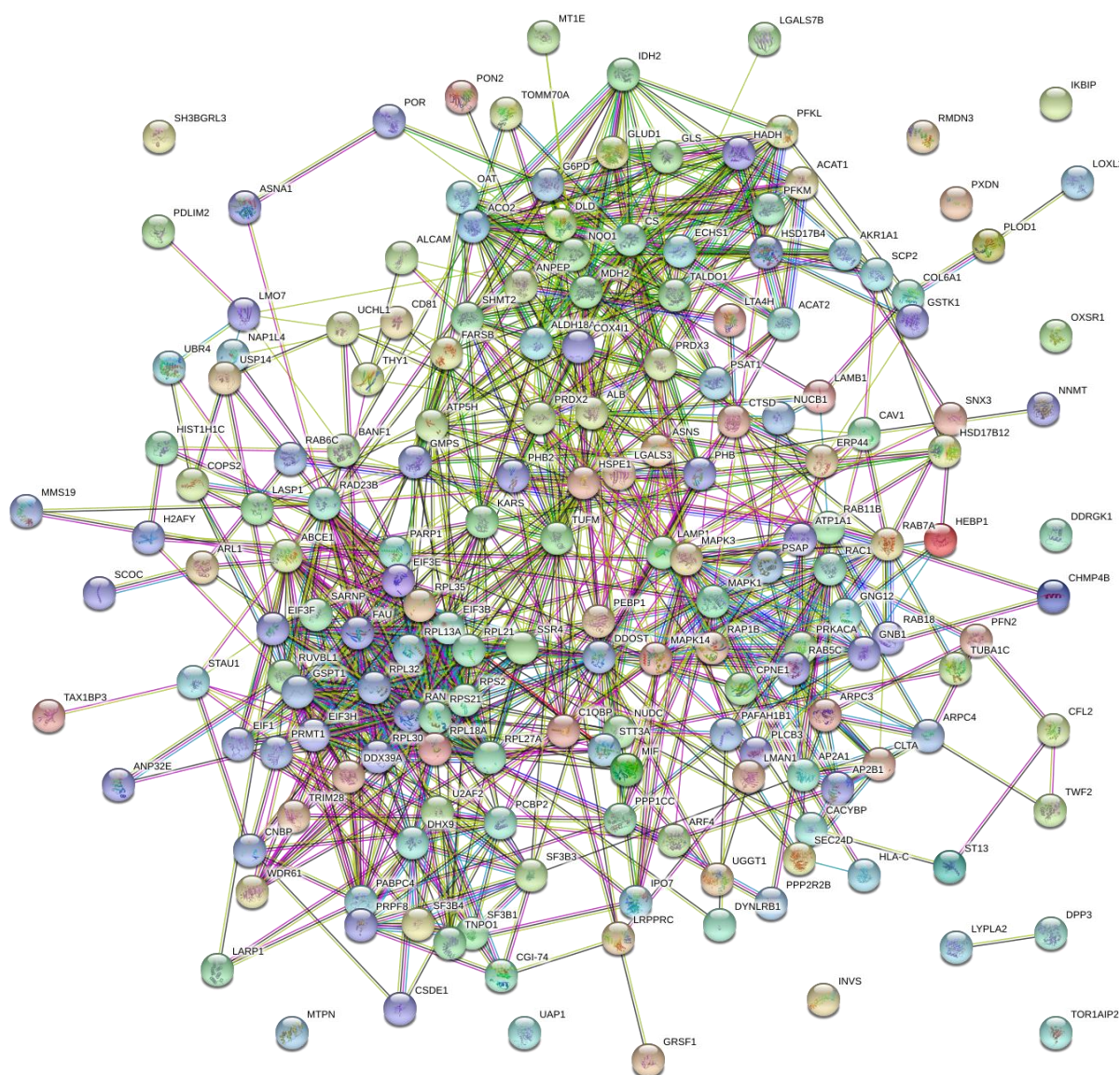
Para saber cuántas y cuáles de estas proteínas estaban expresadas única y exclusivamente en las células pro-neuronales de los consumidores de cannabis, se utilizó el software online Venny. Tras cotejar los datos, el programa identificó un conjunto de 178 proteínas exclusivas del consumo de cannabis, mientras que otras 133 sólo se identificaron en las células de donantes sanos (Figura 7). En el Apéndice 11.1. quedan recogidas, por su identificador y nombre, las 178 proteínas exclusivas del cannabis.



**Figura 7.** Diagrama de Venn en el que se muestra el número de proteínas exclusivas de Control Sano (133) y de Consumo de Cannabis (178), y el número de proteínas comunes a ambas condiciones de estudio (540).

### 6.3.2. Potenciales dianas terapéuticas: Clasificación y caracterización funcional de las proteínas diferencialmente expresadas

Tras introducir las 178 proteínas exclusivas en el software online String, se obtuvo un mapa de interacción con 178 nodos (Figura 8) lo que indica un alto grado de interacción biológica entre ellas, siendo mayor esta interconexión cuanto menor es la distancia que las separa. Este hecho nos permitió poder clasificar a las proteínas en tres grandes grupos según los procesos en los que estaban implicadas. Como se observa en la Figura 8, el primer conjunto (en la parte superior de la imagen) pertenece a procesos relacionados con el metabolismo, el segundo (en la parte inferior a la derecha) a procesos relacionados con la sinapsis y, por último, el tercer grupo (en la parte inferior a la izquierda) está relacionado con eventos de la expresión génica. Tras esta primera clasificación, nos centramos en el estudio en profundidad de las proteínas que se encontraban implicadas en el metabolismo y los eventos sinápticos.



**Figura 8.** Mapa de interacciones entre las proteínas proporcionado por String

En relación al metabolismo (ID pathway 01100 – *identificador del mapa de las rutas metabólicas contenidas en la base de datos Kegg Pathway*), se obtuvieron 35 proteínas diferencialmente expresadas, 22 de las cuales quedan recogidas en la Tabla 2. Muchas de ellas cursan su actividad en más de una ruta metabólica. A continuación, se detallan las principales rutas y las proteínas diferencialmente expresadas en cada una de ellas:

- Ruta de las pentosas fosfato (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*<sup>33</sup>, *ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type*<sup>34</sup>, *ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type*<sup>35</sup>, *Transaldolase* <sup>136</sup>).

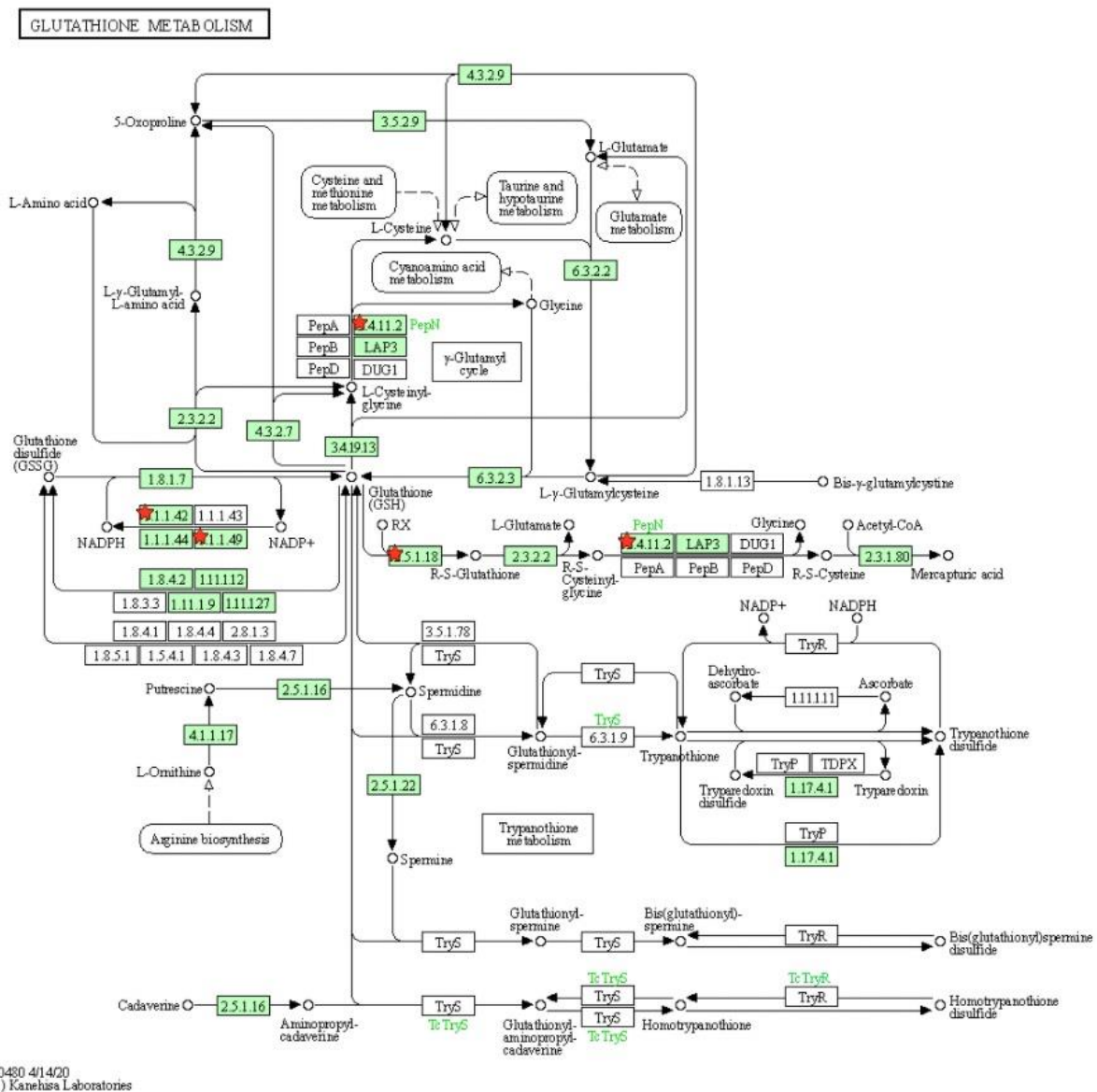


- Glucólisis (*Aldo-keto reductase family 1 member A1*<sup>37</sup>, *ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type*<sup>34</sup>, *ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type*<sup>35</sup>, *Dihydrolipoamide dehydrogenase*<sup>38</sup>).
- Ciclo de Krebs (*Citrate synthase*<sup>39</sup>, *Aconitase* 2<sup>40</sup>, *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial*<sup>41</sup>, *Dihydrolipoamide dehydrogenase*<sup>38</sup>, *Malate dehydrogenase* 2<sup>42</sup>).
- Metabolismo del piruvato (*Dihydrolipoamide dehydrogenase*<sup>38</sup>, *Malate dehydrogenase* 2<sup>42</sup>, *Acetyl-CoA acetyltransferase* 1<sup>43</sup>, *Acetyl-CoA acetyltransferase* 2<sup>44</sup>).
- Metabolismo del glutatión (*Aminopeptidase* N<sup>45</sup>, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*<sup>33</sup>, *Glutathione S-transferase kappa* 1<sup>46</sup>, *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial*<sup>41</sup>).
- Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico (*Aconitase* 2<sup>40</sup>, *Citrate synthase*<sup>39</sup>, *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial*<sup>41</sup>).
- Metabolismo de la D-glutamina y del D-glutamato (*Glutamate dehydrogenase* 1<sup>47</sup>, *Glutaminase kidney isoform*<sup>48</sup>).
- Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato (*Asparagine synthetase*<sup>49</sup>, *Glutamate dehydrogenase* 1<sup>47</sup>, *Glutaminase kidney isoform*<sup>48</sup>).
- Otras dos proteínas que merecen especial atención son la *NAD(P)H dehydrogenase [quinone]* 1<sup>50</sup> y la *NADPH--cytochrome P450 reductase*<sup>51</sup>).

Junto con el metabolismo celular, han de considerarse las proteínas de respuestas al estrés oxidativo (GO:0016209 – *identificador de información relativa a la actividad antioxidante contenida en la base de datos GENE ONTOLOGY*). La exposición temprana al cannabis indujo la expresión diferencial de 5 proteínas relacionadas con esta función tan importante para la homeostasis celular (*Oxidative stress responsive* 1<sup>52</sup>, *Paraoxonase* 2<sup>53</sup>, *Peroxidasin*<sup>54</sup>, *Peroxiredoxin* 2<sup>55</sup>, *Peroxiredoxin* 3<sup>56</sup>) (Tabla 3).

Con objeto de entender mejor la funcionalidad de todas estas proteínas, además de String se utilizó el software DAVID. Esta plataforma nos permitió relacionar las proteínas obtenidas con las diferentes rutas y vías de señalización moleculares representadas en los mapas recogidos en la base de datos Kegg Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Esta relación se fundamenta en el hecho de señalar y resaltar la posición de las proteínas dentro de las rutas en las que intervienen. Para ello, las proteínas que están expresadas diferencialmente dentro de una ruta o vía son marcadas con un distintivo (una estrella roja). El contextualizar de este modo a las proteínas, nos proporcionó una información mayor, más completa e integral de cada una de ellas. En la Figura 9 se presenta, como ejemplo, la vía de señalización asociada al metabolismo del glutatión. En el Apéndice 11.2. quedan recogidos otros mapas metabólicos proporcionados por DAVID.





**Figura 9.** Mapa metabólico proporcionado por DAVID (metabolismo del glutatión).

En lo referente a los eventos sinápticos, son varias las vías de señalización que contribuyen a la función sináptica de las pro-neuronas del ONE. Por esta razón, se hizo una clasificación de las proteínas en dos grandes grupos atendiendo a los dos procesos biológicos más importantes relacionados con la sinapsis: la transmisión del impulso nervioso (GO:0007268 – *identificador de información relativa a la transmisión sináptica química contenida en la base de datos GENE ONTOLOGY*) y la plasticidad estructural (GO:0048812 – *identificador de información relativa a la formación de proyecciones neuronales contenida en la base de datos GENE ONTOLOGY*) de las pro-neuronas.

**Tabla 2.** Proteínas relacionadas con el metabolismo.

Rutas metabólicas		
N.º de proteína	N.º de acceso Uniprot	Nombre
1	P11413	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
2	P08237	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type (PFKM)
3	P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type (PFKL)
4	P37837	Transaldolase 1 (TALDO1)
5	P09622	Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD)
6	O75390	Citrate synthase (CS)
7	Q99798	Aconitase 2 (ACO2)
8	P48735	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial (IDH2)
9	P40926	Malate dehydrogenase 2 (MDH2)
10	P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1)
11	Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase 2 (ACAT2)
12	P30084	Enoyl-CoA hydratase, short chain 1 (ECHS1)
13	P00367	Glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1)
14	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1)
15	P34897	Serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2)
16	P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1 (AKR1A1)
17	P15144	Aminopeptidase N (ANPEP)
18	Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1)
19	O94925	Glutaminase kidney isoform (GLS)
20	P08243	Asparagine synthetase (ASNS)
21	P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1)
22	P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase (POR)

**Tabla 3.** Proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo.

Respuesta al estrés oxidativo		
N.º de proteína	N.º de acceso Uniprot	Nombre
1	O95747	Oxidative stress responsive 1 (OXSRL)
2	Q15165	Paraoxonase 2 (PON2)
3	Q92626	Peroxidasin (PXDNL)
4	P32119	Peroxiredoxin 2 (PRDX2)
5	P30048	Peroxiredoxin 3 (PRDX3)

Por su parte, con respecto a la transmisión del impulso nervioso se encontraron 13 proteínas (Tabla 4). Doce de ellas relacionadas con la endocitosis (ID pathway 04144 – *identificador de la vía de señalización de la endocitosis contenida en la base de datos Kegg Pathway*) y la exocitosis de las vesículas sinápticas (ID pathway 04721– *identificador de la vía de señalización del ciclo de las vesículas sinápticas contenida en la base de datos Kegg Pathway*) (*Ras-related protein Rab-11B*<sup>57</sup>, *Ras-related protein Rab-5C*<sup>58</sup>, *Ras-related protein Rab-7a*<sup>59</sup>, *Actin related protein 2/3 complex subunit 3*<sup>60</sup>, *Actin related protein 2/3 complex subunit 4*<sup>61</sup>, *AP-2 complex subunit alpha-1*<sup>62</sup>, *AP-2 complex subunit beta*<sup>63</sup>, *Caveolin 1*<sup>64</sup>, *Charged multivesicular body protein 4B*<sup>65</sup>, *Clathrin light chain A*<sup>66</sup>, *HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain*<sup>67</sup>, *Sorting nexin-3*<sup>68</sup>) y una relacionada con el transporte axonal retrógrado de dichas vesículas (*platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha*<sup>69</sup>).

**Tabla 4.** Proteínas relacionadas con la transmisión del impulso nervioso.

Transmisión del impulso nervioso		
N.º de proteína	N.º de acceso Uniprot	Nombre
1	Q15907	Ras-related protein Rab-11B (RAB11B)
2	P51148	Ras-related protein Rab-5C (RAB5C)
3	P51149	Ras-related protein Rab-7a (RAB7A)
4	O15145	Actin related protein 2/3 complex subunit 3 (ARPC3)
5	P59998	Actin related protein 2/3 complex subunit 4 (ARPC4)
6	O95782	AP-2 complex subunit alpha-1 (AP2A1)
7	P63010	AP-2 complex subunit beta (AP2B1)
8	Q03135	Caveolin 1 (CAV1)
9	Q9H444	Charged multivesicular body protein 4B (CHMP4B)
10	P09496	Clathrin light chain A (CLTA)
11	Q95604	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain (HLA-C)
12	O60493	Sorting nexin-3 (SNX3)
13	P43034	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha (PAFAH1B1)

En relación a la plasticidad estructural de las neuronas, fueron 10 las proteínas expresadas diferencialmente (Tabla 5). Nueve de ellas (*Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12*<sup>70</sup>, *Actin related protein 2/3 complex subunit 3*<sup>60</sup>, *Actin related protein 2/3 complex subunit 4*<sup>61</sup>, *Cofilin-2*<sup>71</sup>, *Mitogen-activated protein kinase 1*<sup>72</sup>, *Mitogen-activated protein kinase 3*<sup>73</sup>, *Profilin-2*<sup>74</sup>, *Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit*<sup>75</sup>, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*<sup>76</sup>) implicadas en la polimerización de actina (ID pathway 04810 – *identificador de la vía de*

señalización de la regulación del citoesqueleto de actina contenida en la base de datos Kegg Pathway), y una (*tubulin alpha-1C chain*<sup>77</sup>) relacionada con la organización del citoesqueleto de tubulina.

**Tabla 5.** Proteínas relacionadas con la plasticidad estructural neuronal.

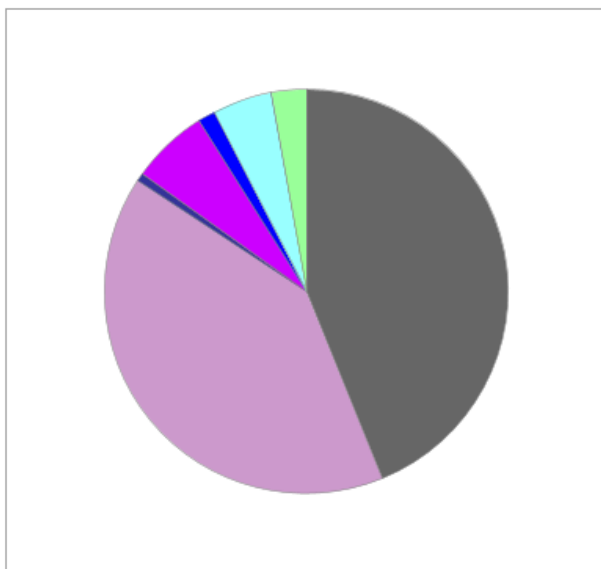
Plasticidad estructural neuronal		
N.º de proteína	N.º de acceso Uniprot	Nombre
1	Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 (GNG12)
2	O15145	Actin related protein 2/3 complex subunit 3 (ARPC3)
3	P59998	Actin related protein 2/3 complex subunit 4 (ARPC4)
4	Q9Y281	Cofilin-2 (CFL2)
5	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1)
6	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3)
7	P35080	Profilin-2 (PFN2)
8	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PPP1CC)
9	P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)
10	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (TUBA1C)

Tras el estudio de los principales procesos y funciones biológicas donde hubo una mayor expresión diferencial, para completar el análisis, se recurrió al software Panther. Las proteínas fueron clasificadas y representadas en diagramas circulares atendiendo a la función molecular ejercida (Figura 10), a la localización celular (componentes celulares) (Figura 11) y al tipo de proteína (Figura 12). Como dato a destacar, el hecho de que, en el diagrama de la función molecular, el segundo grupo de proteínas de mayor representación fueron proteínas relacionadas con la actividad catalítica. Por su parte, en el diagrama relativo al tipo de proteína, el mayor porcentaje de representación recayó sobre enzimas de interconversión metabólica. Esto confirma lo que ya se observó con los dos softwares anteriores: tanto en DAVID como en String los mayores grupos de proteínas diferencialmente expresadas estaban comprometidos con la función metabólica.

Select Ontology: **Molecular Function** View: **100%**

### PANTHER GO-Slim Molecular Function

Total # Genes: 176 Total # function hits: 146



\*\*Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Function hits

Click to get gene list for a category:

- [binding \(GO:0005488\)](#)
- [catalytic activity \(GO:0003824\)](#)
- [molecular function regulator \(GO:0098772\)](#)
- [structural molecule activity \(GO:0005198\)](#)
- [transcription regulator activity \(GO:0140110\)](#)
- [translation regulator activity \(GO:0045182\)](#)
- [transporter activity \(GO:0005215\)](#)

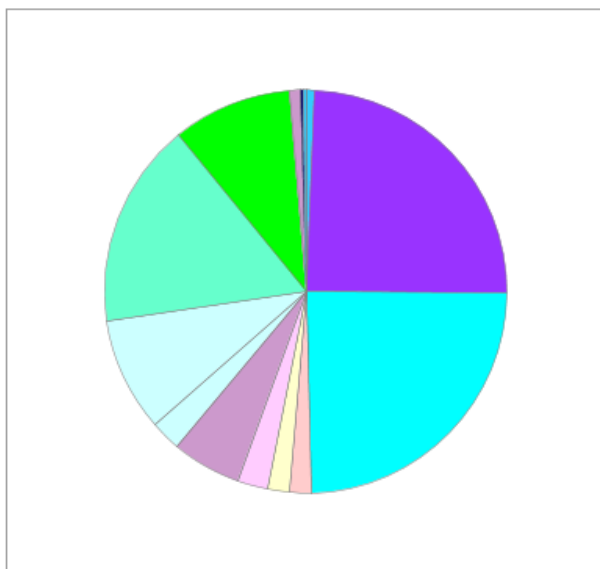
Color picker powered by Web Colors by VisiBone

**Figura 10.** Diagrama de sectores obtenido atendiendo a la función molecular.

Select Ontology: **Cellular Component** View: **100%**

### PANTHER GO-Slim Cellular Component

Total # Genes: 176 Total # component hits: 450



\*\*Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Component hits

Click to get gene list for a category:

- [cell junction \(GO:0030054\)](#)
- [cell part \(GO:0044464\)](#)
- [cell \(GO:0005623\)](#)
- [extracellular region part \(GO:0044421\)](#)
- [extracellular region \(GO:0005576\)](#)
- [membrane part \(GO:0044425\)](#)
- [membrane \(GO:0016020\)](#)
- [membrane-enclosed lumen \(GO:0031974\)](#)
- [organelle part \(GO:0044422\)](#)
- [organelle \(GO:0043226\)](#)
- [protein-containing complex \(GO:0032991\)](#)
- [supramolecular complex \(GO:0099080\)](#)
- [synapse part \(GO:0044456\)](#)
- [synapse \(GO:0045202\)](#)

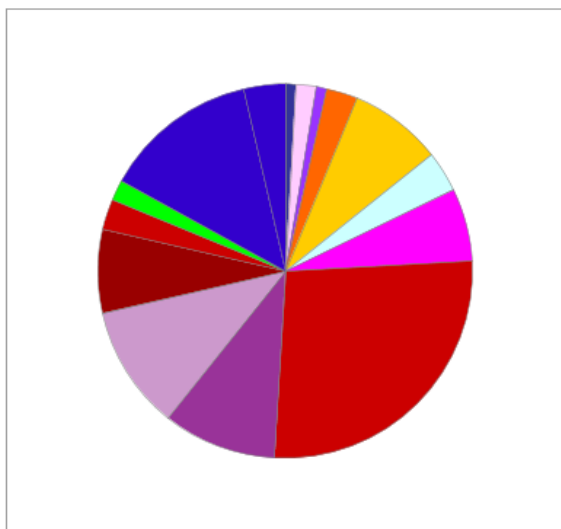
Color picker powered by Web Colors by VisiBone

**Figura 11.** Diagrama de sectores obtenido atendiendo al componente celular.

Select Ontology: Protein Class View: 100%

### PANTHER Protein Class

Total # Genes: 176 Total # protein class hits: 112



Click to get gene list for a category:

- [calcium-binding protein \(PC00060\)](#)
- [cell adhesion molecule \(PC00069\)](#)
- [chaperone \(PC00072\)](#)
- [chromatin/chromatin-binding, or -regulatory protein \(PC00077\)](#)
- [cytoskeletal protein \(PC00085\)](#)
- [extracellular matrix protein \(PC00102\)](#)
- [membrane traffic protein \(PC00150\)](#)
- [metabolite interconversion enzyme \(PC00262\)](#)
- [nucleic acid binding protein \(PC00171\)](#)
- [protein modifying enzyme \(PC00260\)](#)
- [protein-binding activity modulator \(PC00095\)](#)
- [scaffold/adaptor protein \(PC00226\)](#)
- [transfer/carrier protein \(PC00219\)](#)
- [translational protein \(PC00263\)](#)
- [transporter \(PC00227\)](#)

Color picker powered by



\*\*Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Protein Class hits

**Figura 12.** Diagrama de sectores obtenido atendiendo al tipo de proteína.

## 7. DISCUSIÓN

Con el fin de identificar proteínas que pudieran considerarse prometedoras dianas terapéuticas para la prevención y el tratamiento del consumo abusivo de cannabis, en el presente trabajo se llevó a cabo: en primer lugar, un análisis proteómico de la expresión de proteínas en células pro-neuronales de individuos consumidores y no consumidores de cannabis durante la adolescencia, y, en segundo lugar, un análisis bioinformático de las proteínas expresadas de forma diferencial en los consumidores.

En lo referente al análisis electroforético, tras la realización de la SDS-PAGE se corrobora, como puede observarse en la Figura 6, que tanto la lisis celular como la extracción proteica se realizaron de forma correcta. También se puede observar cómo los patrones de proteínas en ambas condiciones de estudio son similares, por lo que las proteínas que se expresan en los sujetos control también lo hacen en los consumidores. De hecho, esa es la razón de que, en conjunto, ambas condiciones expresen 540 proteínas en común, como muestra el diagrama de la Figura 7. Debido a ello, la etiología del cannabis, confirmando lo que se viene indicando a lo largo del trabajo, debe residir en las diferencias de la expresión proteica, y no en las similitudes, entre las células de los individuos control y las de los individuos consumidores.

Una vez concluido el análisis proteómico, como puede observarse en la Tabla 1, las cifras de proteínas identificadas en las 2 muestras de Control Sano (CS1: 562 proteínas identificadas y CS2: 503 proteínas identificadas) son más uniformes que los datos de las 2 muestras de Consumo de Cannabis (CC1: 65 proteínas identificadas y CC2: 709 proteínas identificadas). La anomalía en estos resultados puede deberse a errores de procedimiento en el protocolo de extracción proteica que hayan derivado en una extracción deficiente para la muestra CC1. Aun así, los datos de ambas muestras de Consumo de Cannabis (CC1 y CC2) se tomaron en conjunto para realizar el análisis bioinformático. Aunque cabe señalar que estos son datos preliminares y que es necesario un tamaño de muestra mayor para validar los hallazgos de este estudio, tras procesar los datos obtenidos al realizar la MS se identificaron un total de 178 proteínas expresadas exclusivamente en la condición de consumo de cannabis, es decir, se estaban expresando de forma diferencial con respecto a las células de los sujetos control.

Dentro de este grupo de proteínas específicas del consumo de cannabis, se observó que la función biológica con un mayor número de proteínas expresadas diferencialmente y, por consiguiente, con una mayor representación fue el metabolismo celular. Concretamente, 35 de las 178 proteínas totales estaban implicadas en las rutas metabólicas. Debido a ello, el análisis de los resultados obtenidos se centró en este subconjunto de proteínas. No obstante, con el fin de complementar el estudio de las

células pro-neuronales y tener una visión más global del metabolismo celular se recurrió también al análisis de las proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo. De esta forma, se dio cabida a las proteínas diferencialmente expresadas que, con su actividad, contribuyen a dos de los procesos biológicos más influyentes y representativos de la homeostasis y el mantenimiento de la funcionalidad celular.

Respecto al metabolismo, aunque todas las proteínas con actividad enzimática tienen una importancia reseñable, destacaremos la función de aquellas más relevantes. Dos de estas proteínas son la *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* y la *ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type* por desempeñar una actividad central en el metabolismo. La primera interviene en la ruta de las pentosas fosfato, catalizando el primer paso y limitante de la fase oxidativa en la que se genera NADPH<sup>33</sup>. La segunda cataliza el tercer paso de la glucólisis, una vía citosólica que oxida las moléculas de glucosa en dos moléculas de piruvato<sup>35</sup>. Si tenemos en cuenta la expresión diferencial de esta segunda proteína como un indicio de una posible alteración en la misma, esto conduciría a una deficiencia metabólica en la que no se podría obtener la suficiente cantidad de piruvato como para producir el acetil-CoA que ingrese al ciclo de Krebs y lleve a término la producción normativa de ATP. Esta misma deficiencia en la producción de ATP ocurriría si tenemos en cuenta a la *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial*, una enzima que cataliza la tercera reacción del ciclo de Krebs en la que se produce el 2-oxoglutarato y NADPH<sup>41</sup>.

Muchas reacciones biosintéticas retiran metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs al ser éstos precursores de una gran cantidad de moléculas orgánicas. En este punto, es donde entran en juego las enzimas y reacciones anapleróticas reestableciendo los niveles de dichos metabolitos intermediarios. Es el caso de la *Glutamate dehydrogenase 1*, una enzima que cataliza la reacción de conversión de L-glutamato a 2-oxoglutarato desempeñando un papel clave en la anaplerosis de este metabolito intermediario del ciclo de Krebs<sup>47</sup>. Si esta proteína no ejerce su función de forma adecuada, nos encontraríamos ante otra limitación en la obtención de ATP.

Junto con las proteínas relacionadas con el metabolismo, hemos de destacar aquellas que se encontraron diferencialmente expresadas en relación a la actividad antioxidante o de respuesta al estrés oxidativo (Tabla 3). El hecho de que se hayan identificado estas proteínas indica que el consumo de cannabis induce al estrés oxidativo de las células. Esta asociación ha sido reportada en numerosos estudios previos donde se observa un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) a consecuencia de la exposición al  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol (THC), el principal componente psicoactivo del cannabis<sup>78,79</sup>. Las ROS son producidas de forma



constitutiva por las reacciones y procesos de oxido-reducción que se llevan a cabo en nuestro organismo. El estrés oxidativo, por tanto, supone un desequilibrio entre las reacciones redox y el sistema antioxidante<sup>80</sup>. En este contexto, tres de las proteínas expresadas juegan un papel fundamental. Por su parte, la *Glutathione S-transferase kappa 1*, es una enzima relacionada con el metabolismo del glutatión, el principal antioxidante endógeno que protege a las células de cualquier daño o estrés oxidativo. Para ello, actúa como un agente reductor que, en el proceso, cambia de su forma reducida (GSH) a sus formas oxidadas (GSSG, disulfuro de glutatión o R-S-Glutatión, glutatión en su forma oxidada sustituida), consiguiendo así que las ROS se reduzcan dando lugar a especies menos reactivas<sup>46,81,82</sup>. Por lo tanto, el sistema del glutatión está conectado con todas aquellas reacciones oxidativas del metabolismo en las que intervienen enzimas pro-oxidantes que generan ROS. Es el caso de la *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* y la *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial*. Si alguna de estas dos proteínas – y, en su conjunto, las rutas metabólicas en las que participan, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs, respectivamente – no realiza su función de forma correcta, podemos encontrarnos ante dos situaciones. Por una parte, si las rutas son ineficientes, no se producirá suficiente cantidad de NADPH para regenerar el glutatión oxidado a su forma reducida (GSH) y que éste pueda contribuir a la reducción de las ROS. Y, por otra parte, si las rutas exceden su actividad normal, se generará una mayor cantidad de ROS. Una u otra condición conducen a la célula al estrés oxidativo. La cuantificación de los niveles de GSH es una medida del estado oxidativo de las células. Kopjar et al.; (2019) observaron una significativa elevación en los niveles de GSH en el tejido cerebral de ratas tras la exposición al THC<sup>83</sup>.

Todos estos eventos metabólicos y de respuesta al estrés oxidativo, si no se llevaran a cabo de forma correcta, culminarían en una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, hecho que corrobora la presencia de otra enzima expresada de forma diferencial. Se trata de la *NADPH--cytochrome P450 reductase*, una enzima necesaria para la transferencia de electrones del NADP al citocromo P450<sup>51</sup>. Numerosos estudios señalan al THC como inductor de la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial del cerebro, aumentando el estrés oxidativo propiciado por un aumento de las ROS<sup>78</sup>.

Por su parte, numerosos estudios sobre la esquizofrenia han señalado la alteración de proteínas implicadas en el estrés oxidativo como consecuencia de la alteración general del metabolismo energético a nivel mitocondrial<sup>84</sup> sugiriendo que estas desviaciones son el mecanismo inductor de la fisiopatología de la enfermedad<sup>85</sup>. Considerando estas premisas y los hallazgos del presente trabajo, hemos de tener en cuenta esta asociación triangular entre el cannabis, la alteración del metabolismo y el estrés oxidativo, y la esquizofrenia como punto de partida en el que continuar trabajando en la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

En definitiva, aunque en las células derivadas de consumidores de cannabis se hayan identificado de forma exclusiva proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto, la transmisión del impulso nervioso, el metabolismo y la respuesta al estrés oxidativo, serán estas dos últimas las funciones más representativas de la condición de la expresión diferencial. Pues, aunque el presente trabajo tenga carácter preliminar, se ha observado que las posibles alteraciones en las células pro-neuronales del ONE establecen sus bases moleculares, de forma mayoritaria, en el metabolismo energético y el estrés oxidativo, dos funciones biológicas esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC. Además, los hallazgos de este trabajo están en la línea de lo recogido y establecido en estudios previos tanto en la condición de consumo de cannabis como en la condición de desarrollo de enfermedades mentales como la esquizofrenia, lo que refuerza el vínculo entre el consumo prolongado de cannabis durante la adolescencia y el riesgo asociado a padecer un trastorno psiquiátrico. Por último, resaltar que los resultados obtenidos poseen un elevado interés al demostrar que las alteraciones producidas en el SNC de los individuos consumidores se mantienen y quedan reflejadas en el cultivo *in vitro* de las células pro-neuronales del ONE, consolidándose así como un sistema celular modelo en el estudio de la adicción al cannabis y sus consecuencias neurobiológicas asociadas.

## 8. CONCLUSIONES

- El cultivo *in vitro* de células pro-neuronales del neuroepitelio olfativo constituye un modelo celular prometedor como sistema de estudio en la investigación de la adicción al cannabis y sus consecuencias neurobiológicas asociadas a la salud mental. Son muchas las características que favorecen el uso de este tipo de células, pero la más reseñable es su facilidad de acceso para la toma de las muestras de individuos vivos permitiéndonos obtener datos más próximos a la situación real del propio individuo.
- Las herramientas proteómicas y bioinformáticas empleadas nos han permitido, con éxito, detectar e identificar la expresión de proteínas de forma diferencial en ambas condiciones de estudio, así como poder realizar una clasificación y caracterización funcional de las mismas con objeto de entender mejor las funciones moleculares y los procesos biológicos comprometidos en las células pro-neuronales relacionadas con el consumo de cannabis.
- Entre las proteínas identificadas como exclusivas del consumo prolongado de cannabis durante la adolescencia, se encontraron 10 relacionadas con la organización del citoesqueleto y la plasticidad estructural neuronal, 13 con la transmisión del impulso nervioso, 35 con el metabolismo y 5 con la respuesta al estrés oxidativo. Debido a que estos dos subgrupos últimos suponen la mayor representación del conjunto total de las proteínas diferencialmente expresadas y que algunas de ellas se han visto alteradas en estudios previos, fue sobre éstas sobre las que se realizó un análisis más exhaustivo, al ser un grupo candidato en el que podrían encontrarse potenciales dianas terapéuticas.

## 9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En vista a todos los hallazgos relevantes del presente trabajo, son muchas las futuras líneas de investigación que podrían realizarse.

- En primer lugar, sería necesario completar el estudio realizado, analizando para ello la expresión diferencial de las células de los sujetos control. Al abordar las 133 proteínas expresadas exclusivamente en los individuos no consumidores estaríamos integrando una valiosa información relacionada con las funciones biológicas que estas proteínas realizan en las células sanas y que, por tanto, no se están llevando a cabo en las células relacionadas con el consumo de cannabis.
- Otra de las líneas de trabajo en la que se podría encauzar la investigación sería una validación de las proteínas consideradas como potenciales dianas terapéuticas mediante un ensayo por Western-blot.
- Una tercera posibilidad se fundamentaría en el bloqueo de la expresión de alguna de estas proteínas expresadas de forma diferencial utilizando para ello la tecnología del ARN interferente. Con el estudio del silenciamiento de estos genes, se podría evaluar si este bloqueo revierte o no el proceso patológico asociado al consumo prolongado de cannabis durante la adolescencia.
- Por último, se podrían analizar los datos mediante la realización de un análisis cuantitativo libre de marcaje o "label-free" basado en la intensidad de los cromatogramas y los espectros obtenidos mediante programas como MaxQuant.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. *World Drug Report 2020* (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6).
2. Vaucher, J., Keating, B.J., Lasserre, A.M., Gan, W., Lyall, D.M., ... & Holmes, M.V. (2018). Cannabis use and risk of schizophrenia: a Mendelian randomization study. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1287-1292.
3. Bagot, K.S., Milin, R. & Kaminer, Y. (2015). Adolescent Initiation of Cannabis Use and Early-Onset Psychosis. *Substance Abuse*, 36(4), 524-533.
4. Henquet, C., Krabbendam, L., Spauwen, J., Kaplan, C., Lieb, R., Wittchen, H.U. & van OS, J. (2005). Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *British Medical Journal*, 330(7481), 11.
5. Schneider, M. (2009). Cannabis use in pregnancy and early life and its consequences: animal models. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 259(7), 383-393.
6. Rapp, C., Bugra, H., Riecher-Rössler, A., Tamagni, C. & Borgwardt, S. (2012). Effects of cannabis use on human brain structure in psychosis: a systematic review combining in vivo structural neuroimaging and post mortem studies. *Current Pharmaceutical Design*, 18(32), 5070-5080.
7. Ferrer, I., Martinez, A., Boluda, S., Parchi, P. & Barrachina, M. (2008). Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell and Tissue Banking*, 9(3), 181-194.
8. Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95.
9. Guennewig, B., Bitar, M., Obiorah, I., Hanks, J., O'Brien, E.A., ... & Barry, G. (2018). THC exposure of human iPSC neurons impacts genes associated with neuropsychiatric disorders. *Translational Psychiatry*, 8(1), 89.
10. Nagel, M.D., Zagury, D. & Nahas, G. (1973). Induction de la transformation lymphoblastique chez la souris par le delta-9-tetrahydrocannabinol [Induction of lymphoblastic transformation with delta-9-tetrahydrocannabinol in mice]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*, 276(6), 1089-1091.
11. Styrzewska, M., Kulma, A., Ratajczak, K., Amarowicz, R. & Szopa, J. (2012). Cannabinoid-like anti-inflammatory compounds from flax fiber. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 17(3), 479-499.
12. Heinbockel, T. & Wang, Z.J. (2015). Cellular Mechanisms of Action of Drug Abuse on Olfactory Neurons. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(1).

13. Benitez-King, G., Riquelme, A., Ortiz-Lopez, L., Berlanga, C., Rodriguez-Verdugo, M. S., Romo, F., ... & Ramirez-Rodriguez, G. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1), 35-45.
14. Hahn, C.G., Han, L.Y., Rawson, N.E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R.H. & Arnold, S. E. (2005). In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 483(2), 154-163.
15. Leung, C.T., Coulombe, P.A. & Reed, R.R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature Neuroscience*, 10, 720-726.
16. Graziadei, P.P.C. & Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of Neurocytology*, 8(1), 1-18.
17. Durante, M.A., Kurtenbach, S., Sargi, Z.B., Harbour, J.W., Choi, R., Kurtenbach, S., ... & Goldstein, B.J. (2020). Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans. *Nature Neuroscience*, 23(3), 323-326.
18. Féron, F., Perry, C., McGrath, J.J. & Mackay-Sim, A. (1998). New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 124(8), 861-866.
19. Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Barrios, A.W., López Amado, M. & Vega, J.A. (2019). Anatomy of the olfactory mucosa. *Handbook of Clinical Neurology*, 164, 47-65.
20. Morrison, E.E. & Costanzo, R.M. (1990). Morphology of the human olfactory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 297(1), 1-13.
21. Morrison, E.E. & Costanzo, R.M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 23(1), 49-61.
22. Solís-Chagoyán, H., Domínguez-Alonso, A., Calixto, E. & Benítez-King, G. (2012). El cultivo de precursores neuronales del epitelio olfatorio: Un modelo para estudiar la neurofisiopatología de la esquizofrenia. *Salud Mental*, 35(3), 241-246.
23. Calof, A. L. & Chikaraishi, D. M. (1989). Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron*, 3(1), 115-127.
24. Mackay-Sim, A. & Kittel, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*, 11, 979-984.
25. Holbrook, E.H., Wu, E., Curry, W.T., Lin, D.T. & Schwob, J.E. (2011). Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *The Laryngoscope*, 121(8), 1687-1701.

26. Borgmann-Winter, K., Willard, S.L., Sinclair, D., Mirza, N., Turetsky, B., Berretta, S. & Hahn, C-G. (2015). Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Translational Psychiatry*, 5(3), e527.
27. Bio-Rad (2012). A guide to Polyacrylamide gel electrophoresis and detection. *Technical Bulletin* 6040.
28. Chevalier, F. (2010). Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Science*, 8(1), 23.
29. Martín Gómez, M. C. & Ballesteros González, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
30. Gibson, D. & Costello, C. E. (2000). Mass spectrometry of biomolecules. En S. Ahuja (Ed.), *Handbook of Bioseparations* (1ª ed., Vol. 2, pp. 299-327). Academic Press.
31. Kaech, S., Fischer, M., Doll, T. & Matus, A. (1997). Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *Journal of Neuroscience*, 17(24), 9565-9572.
32. Mullen, R. J., Buck, C. R. & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
33. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P11413>
34. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08237>
35. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P17858>
36. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P37837>
37. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14550>
38. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P09622>
39. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/O75390>
40. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99798>
41. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P48735>
42. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P40926>

43. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P24752>
44. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BWD1>
45. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P15144>
46. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y2Q3>
47. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P00367>
48. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/O94925>
49. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P08243>
50. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P15559>
51. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P16435>
52. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/O95747>
53. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q15165>
54. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q92626>
55. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P32119>
56. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P30048>
57. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q15907>
58. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P51148>
59. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P51149>



60. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/O15145>
61. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P59998>
62. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/O95782>
63. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P63010>
64. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q03135>
65. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H444>
66. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P09496>
67. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10321>
68. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/O60493>
69. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P43034>
70. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBI6>
71. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y281>
72. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P28482>
73. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P27361>
74. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35080>
75. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P36873>
76. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P63000>

77. Uniprot (2020). Información sobre proteínas. Septiembre 20, 2020 de Uniprot. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BQE3>
78. Wolff, V., Schlagowski, A.I., Rouyer, O., Charles, A. L., Singh, F., ... & Geny, B. (2015). Tetrahydrocannabinol induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress: a potential mechanism involved in cannabis-related stroke. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 323706, 7 pages.
79. Sarafian, T. A., Magallanes, J. A., Shau, H., Tashkin, D. & Roth, M. D. (1999). Oxidative stress produced by marijuana smoke. An adverse effect enhanced by cannabinoids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Molecular and Cellular Biology*, 20, 1286–1293.
80. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
81. Dominko, K. & Đikić, D. (2018). Glutathionylation: A regulatory role of glutathione in physiological processes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69, 1–24.
82. Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S. & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6, 183–197.
83. Kopjar, N., Fuchs, N., Žunec, S., Mikolic, A., Micek, V., ... & Karaconji, I. B. (2019). DNA Damaging Effects, Oxidative Stress Responses and Cholinesterase Activity in Blood and Brain of Wistar Rats Exposed to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *Molecules*, 24(8), 1560.
84. Prabakaran, S., Swatton, J. E., Ryan, M. M., Huffaker, S. J., Huang, J. J., Griffin, J. L., ... & Karp, N. A. (2004). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular psychiatry*, 9(7), 684.
85. Barron, H., Hafizi, S., Andreazza, A.C. & Mizrahi, R. (2017). Neuroinflammation and oxidative stress in psychosis and psychosis risk. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 651.

## 11. APÉNDICES

### 11.1. Listado de proteínas exclusivas de consumidores de cannabis

N.º de proteína	N.º de acceso Uniprot	Nombre
1	P02768	Albumin (ALB)
2	Q95604	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain (HLA-C)
3	Q8WWI1	LIM domain only protein 7 (LMO-7)
4	Q14847	LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1)
5	P63220	40S ribosomal protein S21 (RPS21)
6	P04732	Metallothionein-1E (MT-1E)
7	Q96JY6	PDZ and LIM domain protein 2 (PDLIM2)
8	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (TUBA1C)
9	P16403	Histone H1.2 (H1-2)
10	P62633	Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP)
11	P47929	Galectin-7 (LGALS7)
12	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10)
13	P82979	SAP domain-containing ribonucleoprotein (SARNP)
14	P62861	40S ribosomal protein S30 (FAU)
15	P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B (RAD23B)
16	P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial (SHMT2)
17	P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1)
18	P18085	ADP-ribosylation factor 4 (ARF4)
19	P15144	Aminopeptidase N (ANPEP)
20	Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2)
21	Q9Y281	Cofilin-2 (CFL2)
22	Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 (PABPC4)
23	P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (DDOST)
24	P12109	Collagen alpha-1(VI) chain (COL6A1)
25	Q99623	Prohibitin-2 (PHB2)
26	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (ATP1A1)
27	Q16222	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase (UAP1)
28	P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (EIF3E)

29	P46776	60S ribosomal protein L27a (RPL27A)
30	O95782	AP-2 complex subunit alpha-1 (AP2A1)
31	P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial (ECHS1)
32	O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F (EIF3F)
33	P58546	Myotrophin (MTPN)
34	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1)
35	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial (MDH2)
36	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PPP1CC)
37	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD)
38	P04216	Thy-1 membrane glycoprotein (THY1)
39	P35232	Prohibitin (PHB)
40	P51148	Ras-related protein Rab-5C (RAB5C)
41	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A (DHX9)
42	P62888	60S ribosomal protein L30 (RPL30)
43	Q15427	Splicing factor 3B subunit 4 (SF3B4)
44	P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase (POR)
45	O75390	Citrate synthase, mitochondrial (CS)
46	P15880	40S ribosomal protein S2 (RPS2)
47	P37837	Transaldolase (TALDO1)
48	Q9NYU2	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGGT1)
49	Q15907	Ras-related protein Rab-11B (RAB11B)
50	Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (ACAT2)
51	Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4 (NAP1L4)
52	P50502	Hsc70-interacting protein (ST13)
53	Q9Y4K0	Lysyl oxidase homolog 2 (LOXL2)
54	Q9Y265	RuvB-like 1 (RUVBL1)
55	P51149	Ras-related protein Rab-7a (RAB7A)
56	P63010	AP-2 complex subunit beta (AP2B1)
57	O95373	Importin-7 (IPO7)
58	Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (HADH)
59	P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (HSD17B4)
60	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial (OAT)
61	Q9Y383	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 (LUC7L2)

62	Q13740	CD166 antigen (ALCAM)
63	P07339	Cathepsin D (CTSD)
64	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (TUFM)
65	P08243	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (ASNS)
66	P62910	60S ribosomal protein L32 (RPL32)
67	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (PRDX3)
68	Q9GZS3	WD repeat-containing protein 61 (WDR61)
69	Q96T76	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (MMS19)
70	P61224	Ras-related protein Rap-1b (RAP1B)
71	Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial (ACO2)
72	P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (USP14)
73	Q02543	60S ribosomal protein L18a (RPL18A)
74	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (GNB1)
75	P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH2)
76	P35080	Profilin-2 (PFN2)
77	P40616	ADP-ribosylation factor-like protein 1 (ARL1)
78	Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 (PLOD1)
79	Q9H0N0	Ras-related protein Rab-6C (RAB6C)
80	Q6IBS0	Twinfilin-2 (TWF2)
81	O75534	Cold shock domain-containing protein E1 (CSDE1)
82	P40429	60S ribosomal protein L13a (RPL13A)
83	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)
84	P14174	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)
85	O95372	Acyl-protein thioesterase 2 (LYPLA2)
86	O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A (DDX39A)
87	P32119	Peroxiredoxin-2 (PRDX2)
88	P22307	Non-specific lipid-transfer protein (SCP2)
89	P41567	Eukaryotic translation initiation factor 1 (EIF1)
90	O95747	Serine/threonine-protein kinase OSR1 (OXSR1)
91	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1)
92	O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial (ATP5PD)
93	Q70UQ0	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein (IKBIP)
94	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial (C1QBP)

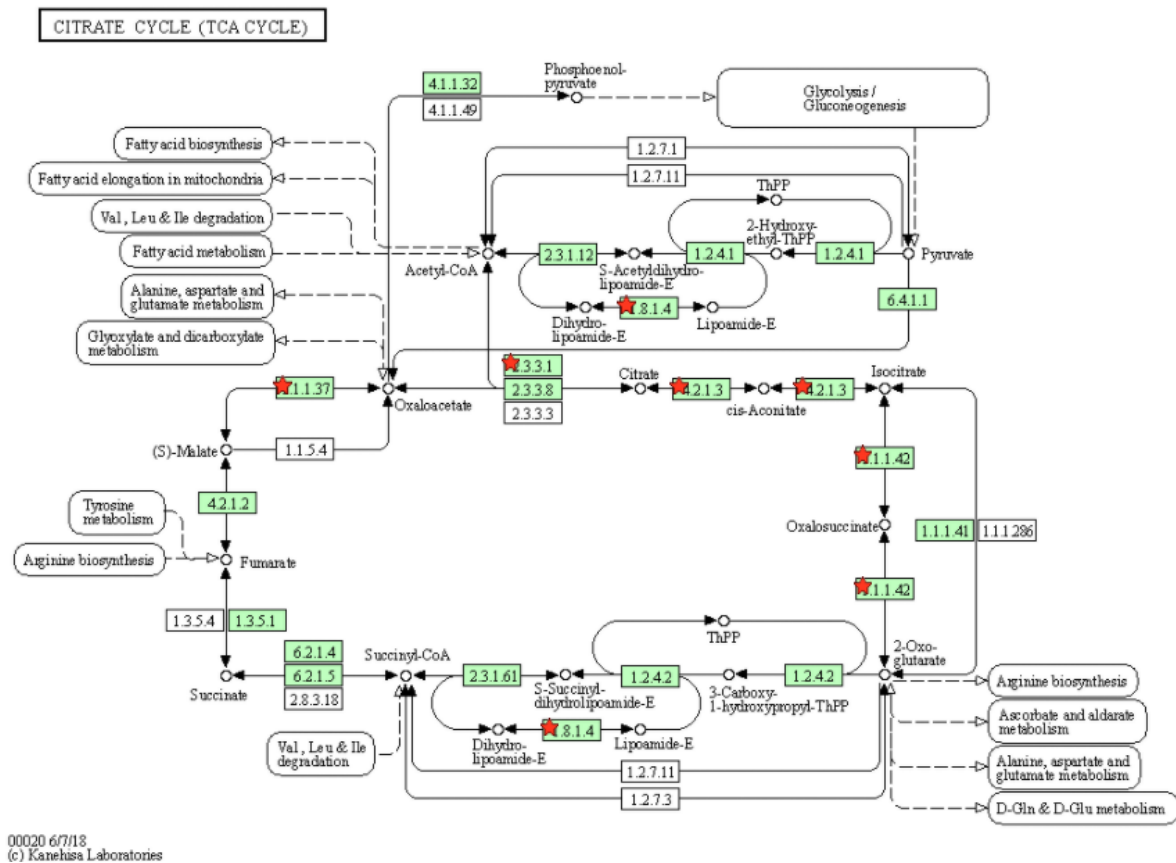
95	Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1 (DYNLRB1)
96	O75533	Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1)
97	Q01970	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 (PLCB3)
98	P51571	Translocon-associated protein subunit delta (SSR4)
99	Q96HY6	DDRGK domain-containing protein 1 (DDRGK1)
100	Q03135	Caveolin-1 (CAV1)
101	P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 (ARPC4)
102	O14907	Tax1-binding protein 3 (TAX1BP3)
103	O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial (GLS)
104	Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1)
105	P07942	Laminin subunit beta-1 (LAMB1)
106	Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3)
107	Q16539	Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)
108	P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (DLD)
109	Q8NFAQ	Torsin-1A-interacting protein 2 (TOR1AIP2)
110	O75531	Barrier-to-autointegration factor (BANF1)
111	O95793	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1 (STAU1)
112	Q53GQ0	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (HSD17B12)
113	P17931	Galectin-3 (LGALS3)
114	Q15393	Splicing factor 3B subunit 3 (SF3B3)
115	P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1 (AKR1A1)
116	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GLUD1)
117	P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PRKACA)
118	Q9NRV9	Heme-binding protein 1 (HEBP1)
119	Q02818	Nucleobindin-1 (NUCB1)
120	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3)
121	Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2 (PON2)
122	Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44 (ERP44)
123	P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A (STT3A)
124	P08237	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type (PFKM)
125	O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (EIF3H)
126	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial (LRPPRC)
127	P40261	Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)

128	P49257	Protein ERGIC-53 (LMAN1)
129	Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E (ANP32E)
130	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran (RAN)
131	O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (TOMM70)
132	Q00005	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform (PPP2R2B)
133	P46778	60S ribosomal protein L21 (RPL21)
134	Q99829	Copine-1 (CPNE1)
135	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1)
136	P61201	COP9 signalosome complex subunit 2 (COPS2)
137	P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type (PFKL)
138	P07602	Prosaposin (PSAP)
139	O43681	ATPase GET3 (GET3)
140	Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 (SH3BGR13)
141	O75367	Core histone macro-H2A.1 (MACROH2A1)
142	Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b (CHMP4B)
143	Q9Y266	Nuclear migration protein nudC (NUDC)
144	P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (ALDH18A1)
145	Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (PRPF8)
146	Q92973	Transportin-1 (TNPO1)
147	O94855	Protein transport protein Sec24D (SEC24D)
148	Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3 (RMDN3)
149	Q15046	Lysine--tRNA ligase (KARS1)
150	P60033	CD81 antigen (CD81)
151	P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1)
152	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit (FARSB)
153	Q9UIL1	Short coiled-coil protein (SCOC)
154	Q9NP72	Ras-related protein Rab-18 (RAB18)
155	P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial (ACAT1)
156	P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1 (ABCE1)
157	P09960	Leukotriene A-4 hydrolase (LTA4H)
158	P09496	Clathrin light chain A (CLTA)
159	P43034	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit Alpha (PAFAH1B1)
160	P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (GMPS)

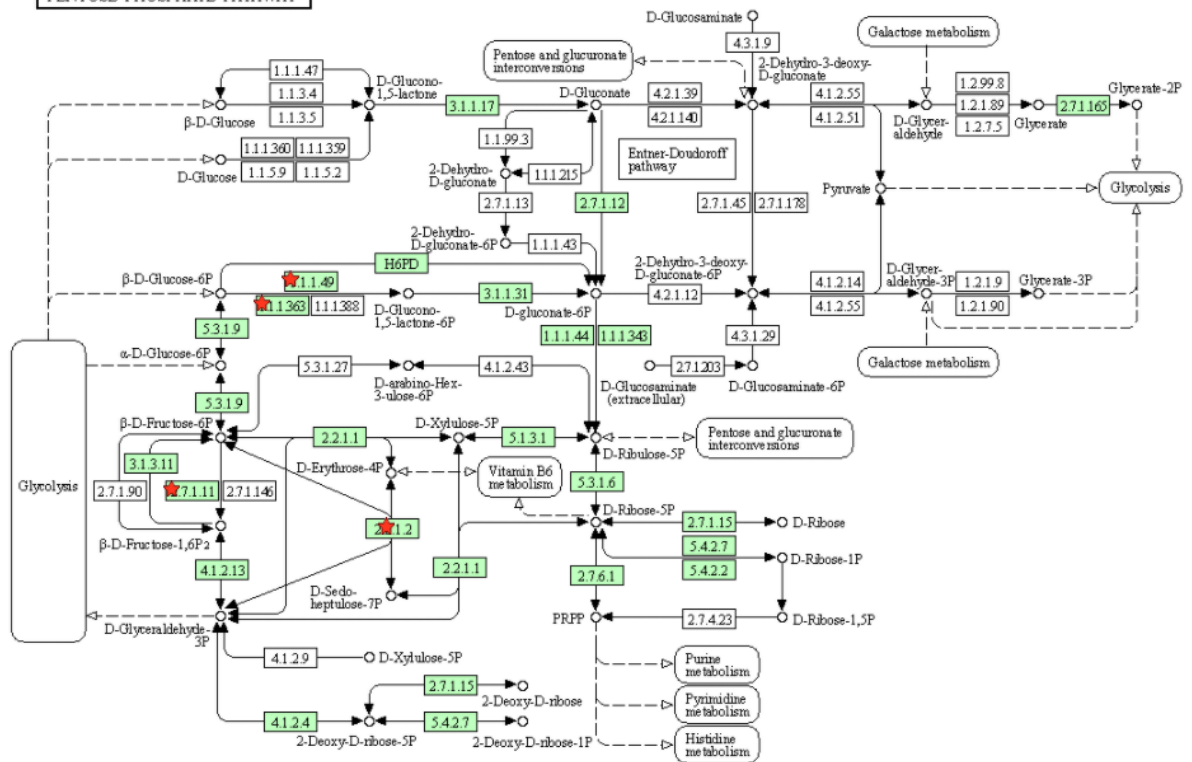
161	P42766	60S ribosomal protein L35 (RPL35)
162	P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (EIF3B)
163	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit (U2AF2)
164	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta (TRIM28)
165	O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3 (ARPC3)
166	Q92626	Peroxidasin homolog (PXDN)
167	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase (PSAT1)
168	Q99873	Protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1)
169	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 (UBR4)
170	Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 (GNG12)
171	P15170	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A (GSPT1)
172	Q9HB71	Calcyclin-binding protein (CACYPB)
173	Q12849	G-rich sequence factor 1 (GRSF1)
174	P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)
175	O60493	Sorting nexin-3 (SNX3)
176	Q6PKG0	La-related protein 1 (LARP1)
177	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (COX4I1)
178	Q9Y283	Inversin (INVS)



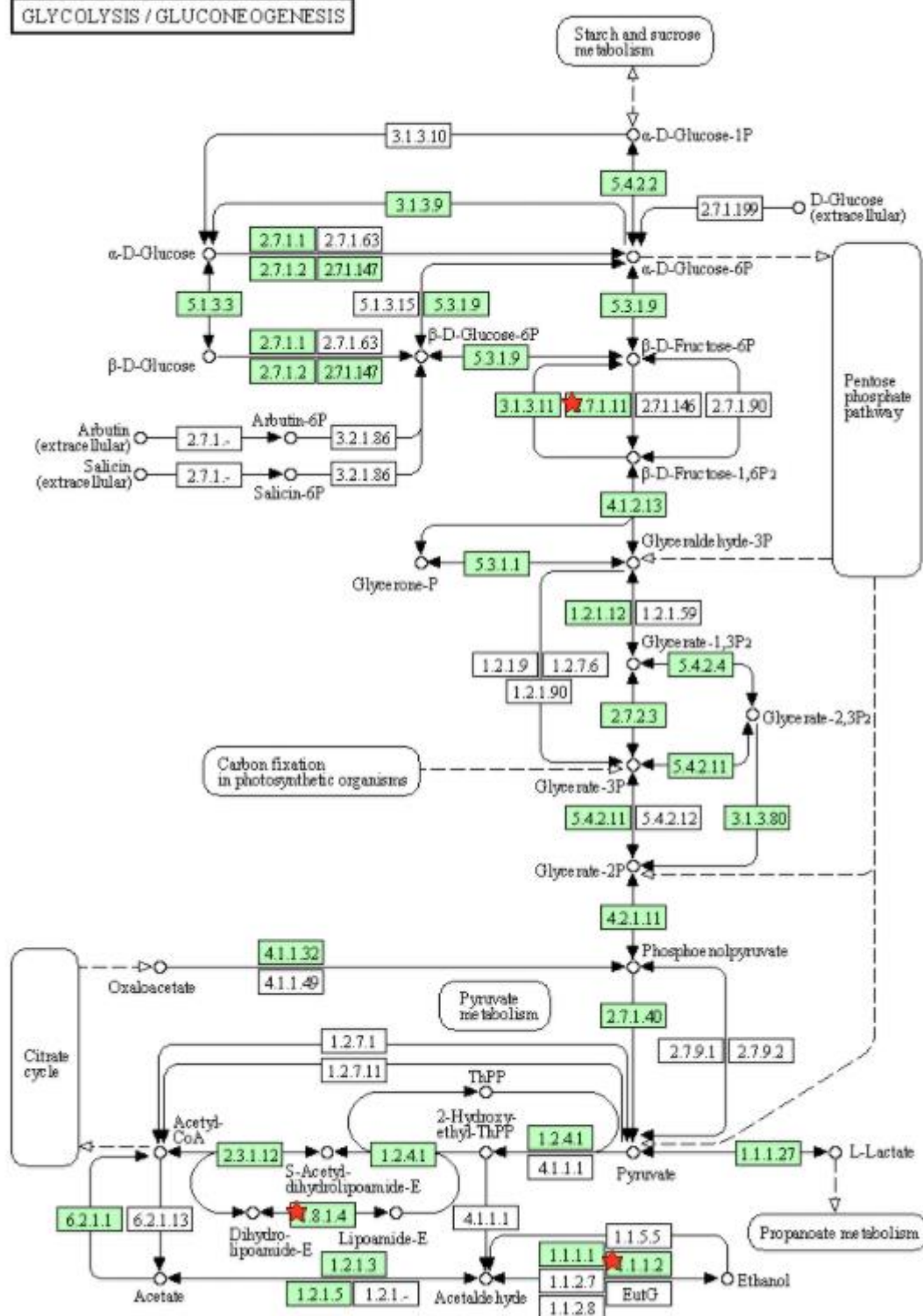
## 11.2. Mapas de rutas metabólicas y vías de señalización proporcionados por DAVID



# PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY



# GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



00010 5/7/20  
(c) Kanehisa Laboratories